Die

Entwicklung der Bakterienfärbung.

Eine historisch-kritische Uebersicht

von

P. G. Unna.

Separat-Abdruck aus dem Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, herausgegeben von Dr. O. Uhlworm in Cassel. III. Band.

Jena.
Verlag von Gustav Fischer.
1888.

Dem

Vater der Bakterienfärbung

Carl Weigert

hochachtungsvoll

gewidmet.

Vorbemerkung.

Durch die freundlichen Zuschriften und Sendungen verschiedener, um die Bakterienfärbung verdienter Autoren war ich in den Stand gesetzt, an dieser neuen Ausgabe meiner Arbeit einige Verbesserungen und Ergänzungen anzubringen, wofür ich denselben meinen besten Dank sage.

Der Verfasser.

Die Entwicklung der bakteriologischen Färbemethoden steht im engsten Zusammenhange mit der Ausbildung der Anilinfarbentechnik bei den Histologen. Die letztere hat seit ihrer speciellen Anwendung auf die Bakteriologie einen noch vor wenigen Jahren ungeahnten Aufschwung gewonnen, und jene wäre geradezu unmöglich gewesen ohne Herbeiziehung des gesammten Anilinfarbenschatzes für ihre Zwecke. Eine ohne die andere Entwicklung zu zeichnen, ist daher unmöglich.

Die Anilinfarben sind bekanntlich nicht sogleich aus den Werkstätten der Chemiker und Färber in die Laboratorien der Histologen hinübergewandert. Nur zaudernd und unsicher sind die Anatomen an die Nutzbarmachung dieser ebenso prachtvollen, wie unerschöpflichen Farbenquelle herangetreten. Jetzt, nachdem die ersten Schwierigkeiten und Mängel der Methodik überwunden sind, können wir allerdings leicht die Erklärung für diese auf den ersten Blick überraschende Thatsache geben.

Die in den fünfziger und sechziger Jahren fast allein am Carmin und Hämatoxylin ausgebildete histologische Färbetechnik liess eben bei den Anilinfarben vollständig im Stich. Es mussten erst eine Reihe neuer Kunstgriffe empirisch ermittelt werden, welche die neuen Farben zu verwerthen ermöglichten, und diese verfehlten ihrerseits nicht, die Anschauungen über histologisches Färben im Allgemeinen zu erweitern und zu klären.

Es ist heute vielleicht schon an der Zeit, einen Rückblick auf die verschiedenen Etappen dieser gemeinschaftlichen Entwicklung zu werfen. Wir stehen zwar, was die tinctorielle Ermittlung auf speciell bakteriologischem Gebiete betrifft, noch mitten in einer erfreulich fruchtbaren Periode des Fortschrittes, ja wenn wir den kurzen Zeitraum von 5 Jahren seit dem Beginne dieser Periode

bedenken, vielleicht erst im Anfange derselben. Aber die zerstreuten und auf den ersten Blick sich häufig widersprechenden Thatsachen unter einige allgemeine Gesichtspunkte zu bringen, kann für die Entwicklung auch dieser Lehre nur förderlich sein. Ich folge daher gerne der Aufforderung der Redaction des Centralblattes für Bakteriologie und Parasitenkunde, zum ersten Male einen solchen Rückblick über das bisher Geleistete zu veranstalten[1]).

Im Beginn der siebziger Jahre waren bereits Anilinfarben in den Händen der meisten Histologen, aber noch Niemand dachte daran, dass dieselben dem Carmin und Hämatoxylin je Concurrenz machen würden. Nur vereinzelte Empfehlungen (Waldeyer, Frey, Merkel u. A.) wurden laut, die ebensowenig warm gegeben, wie aufgenommen, nicht weiter verfolgt wurden. Man war durch die bereits hochgediehene, bewährte Technik der alten Tinctionsmittel verwöhnt. Der Zufall hatte mit dem Carmin den Reigen aller tinctoriellen Versuche eröffnet, welcher einerseits an Unverwüstlichkeit der Färbung heute noch unübertroffen dasteht und andrerseits mit nur geringer Nachhülfe — anscheinend von selbst — jene Differenzirung der histologischen Gebilde herbeiführt, welche das Endziel aller histologischen Färbetechnik ist. Dem gegenüber zeichneten sich nun die neuen Anilinfarben sämmtlich dadurch aus, dass sie zunächst die Gewebe rasch, aber gleichmässig färbten und sowohl bei der planmässigen Entfärbung (nach Ueberfärbung), wie auch schon bei der gewöhnlichen Entwässerung oder Einbettung in den meisten Fällen ebenso gleichmässig aus dem Gewebe wieder ausgezogen wurden. Einzelne Ausnahmen[2]) wurden registrirt, aber

1) Ich mache darauf aufmerksam, dass diese historisch-kritische Studie aus der grossen Fülle von Arbeiten, die sich mit der Färbung von Bakterien befassen, nur diejenigen berücksichtigen will, welche neue Färbungsmethoden eingeführt oder ältere wesentlich verbessert haben. Es gehören also Arbeiten nicht in den Bereich derselben, welche neu aufgefundene Organismen mit älteren Färbemethoden behandeln (z. B. die Rhinoskleromarbeiten von Cornil-Alvarez, Paltauf-Eiselsberg und viele andere), oder welche ältere Färbemethoden auf ihren diagnostischen Werth prüfen (z. B. die Polemik: Wesener-Baumgarten über die Unterscheidung von Lepra- und Tuberkelbacillen), oder welche, wie die erste Kalimethode von Baumgarten, die Tuberkelbacillen ungefärbt im Contrast mit gefärbten, anderweitigen (z. B. Fäulniss-)Bacillen darstellen etc.

2) So z. B. isolirte Färbung des Axencylinders nach Waldeyer (Anilinroth), Huegenin (Dahlia), Hornschicht und Wurzelscheide nach Unna (Jodviolett).

nicht systematisch verfolgt. War die Färbung gelungen und einigermaassen differenzirt ausgefallen, so erwies sie sich gewöhnlich als durchaus unächt und daher für Dauerpräparate ungeeignet.

Der Erste [1]), welcher eine allgemeine Methode angab, durch welche diese auffallendsten Schwächen der Anilinfarben corrigirt wurden, war Hermann, und hiermit beginnt deshalb (erst 1875) die Anilinfarbenära in der Histologie. Hermann (35) zeigte, dass nach starker Ueberfärbung in verschiedenen alkohollöslichen Anilinfarben (besonders Fuchsin) und nachträglichem prolongirten Ausziehen in Alkohol die Kerne den Farbstoff länger zurückhalten als das übrige Gewebe, und dass man durch Entwässerung mittelst Alkohols und Einbettung in Harze diese Färbung conserviren kann. Uebrigens wurde auch diese Mittheilung kaum beachtet, bis Flemming in seinen ersten Arbeiten über Zellkern und Kerntheilung (1877—79) das Hermann'sche Verfahren besonders in Gebrauch zog und später in einem speciellen Aufsatz (17) auf seine Vorzüge für das Studium der Kerntheilung hinwies. Fragen wir uns nach unserem heutigen Wissen, was die Güte und Reinheit der Hermann'schen Kerntinctionen bedingte, so war es wohl zunächst sein neues Princip, die Farben in Mischungen von Alkohol und Wasser (zu gleichen Volumentheilen) zu lösen, während bis dahin meist einfach wässrige oder alkoholische Lösungen angewandt waren. Sodann aber kam gewiss auch für viele und gerade die besten Präparate die vorgängige Härtung in Chromsäure in Betracht.

Flemming brachte an der Hermann'schen Methode noch die Verbesserungen an, dass er einerseits stärkere Farbstofflösungen und andererseits ausschliesslich (für Kerntheilungsfiguren)

---

1) Wie alle Entdeckungen ihre Vorläufer haben, so auch natürlich die erste Methode der Anilinfärbung in der Histologie. Friedländer (Studien über automatische, Herzbewegung 1867) u. Böttcher (Ueber den Aquaeductus vestibuli. Reichert u. Dubois-Reymond's Archiv 1869. pg. 373. Ueber die multiloculären Eierstocksgeschwülste. Virchow's Archiv, Bd. 49. pg. 302) hatten schon lange vorher gelegentlich Angaben über mit Anilinfärbung und Alkoholentfärbung dargestellte Präparate gemacht. Hermann ist aber der Erste, welcher diese Methode so verbesserte und verallgemeinerte, dass sie der Wissenschaft erhebliche Dienste leisten konnte.

Chromsäure — später seine Säuregemische — zum Fixiren benutzte; Safranin, Magdalaroth und Dahlia (in wässriger Lösung) bewährten sich hierzu am meisten. Die Fixirung in Chromsäure empfahl Flemming lediglich aus dem Grunde, weil durch sie die feinere Kernstructur weit besser erhalten wird als durch Alkohol, chromsaure Salze etc. Heute müssen wir in diesem empirischen Hinweis von Hermann-Flemming auf die Chromsäure noch etwas Anderes erblicken. Die höhere Farbkräftigkeit und Haltbarkeit der Chromsäure-Kernpräparate den Alkoholpräparaten gegenüber ist nämlich dadurch bedingt, dass die Chromsäure hier nebenbei die Rolle einer Beize für die Anilinfärbung der Kerne spielt.

Das Verfahren von Hermann-Flemming ist die erste und zugleich eine der einfachsten Methoden der Anilinfärbung. Wir wollen sie sachlich die Chromsäure-Alkoholmethode für Kernfärbungen nennen, indem wir hier, wie auch im späteren Verlaufe dieser Uebersicht, öfter die Methode durch die Beize und das Entfärbungsmittel charakterisiren, welche die Hauptrolle in demselben spielen. Hier [1]) war zum ersten Male für den bestimmten Fall der Kerntinctionen ganz allgemein die Brauchbarkeit der Anilinfarben (speciell basischer) constatirt; mit anderen Worten: es war den Anilinfarben ein specifisches Färbevermögen bei entsprechender Behandlung zuerkannt. Eine grosse Reihe in den nächsten Jahren gefundener einzelner Reactionen von bestimmten Anilinfarben auf bestimmte, chemisch differente Gewebe brachte diese Thatsache rasch zur allgemeinen Geltung. Es sei beispielsweise nur an die von Wissowzky gefundene und von ihm und von von Thanhoffer studirte specifische Eosinfärbung des Hämoglobins, an die von Jürgens entdeckte Election des Jodvioletts für amyloide Substanz erinnnert. Auch die verschiedenartige Wirkung einzelner Farbstoffe auf verschiedene Gewebsbestandtheile, wie sie Calberla vom Methylgrün und Indulin, Dreschfeld und Renaut vom Eosin, Weigert vom Bismarckbraun und Säure-

1) Ich glaube — im strieten Gegensatz zu Gierke (pag. 188 ff.) —, dass die Wirksamkeit der Hermann-Flemming'schen Methode in letzter Instanz auf der chemischen Verwandtschaft basischer Anilinfarbstoffe zum Nuclein beruht (s. auch Fol's Lehrbuch). Dass dieselbe durch Chromsäure als Beize erleichtert wird, ist ebenfalls retrospective Auffassung des Referenten.

fuchsin nachwiesen, beruht auf demselben Princip specifischer Farbenauslese.

In allen diesen Funden, so wichtig sie im Einzelnen sein mögen, liegt kein principieller weiterer Fortschritt. Einen solchen dagegen erblicke ich in einer kleinen Arbeit von Ehrlich (9), dem Erstlingswerk dieses Autors, welche bald nach der Mittheilung Hermann's erschien. Es ist die Einführung saurer Lösungen von basischen Anilinfarben. Dass Säuren, speciell die von Ehrlich empfohlene Essigsäure, zur nachträglichen Differenzirung diverser Färbungen benutzt werden können, ist stets allgemein bekannt gewesen, solange die Histologen sich tinctorieller Methoden bedienten. Wurde doch die Essigsäure schon vordem allgemein angewandt, um in frischem Gewebe die Kerne hervorzuheben. Später empfahl Thiersch die Oxalsäure, Schweigger-Seidel und Neumann die Salzsäure, Ranvier die Ameisensäure für Carminpräparate, Eisessig wurde vom Ref. für Hämatoxylinschnitte zur besseren Differenzirung gerühmt u. s. f. Diese Proceduren stützen sich auf zwei genügend bekannte, aber nicht immer beachtete und wohl auseinanderzuhaltende Vorgänge. Einmal quellen nämlich durch Säuren einige Gewebe (Protoplasma, Collagen), während andere intact bleiben oder sogar schrumpfen (Elastin, Keratin, Nuclein). Geschrumpfte Gewebe färben sich aber aus physikalischen Gründen stets rascher und leichter und entfärben sich langsamer und schwerer als gequollene. Zweitens aber sind die Säuren für viele Farbstoffe energische Lösungsmittel. Während der Lösung des überschüssigen am Gewebe haftenden Farbstoffs durch die Säure ist durch die gleichzeitige, ungleichmässige Veränderung der physikalischen Constitution des Gewebes die beste Gelegenheit zu einer ausgiebigen Differenzirung gegeben; es tritt hin und wieder sogar eine vollständige Inversion der Färbung ein (Umwandlung der Protoplasma- in Kernfärbung).

Diese Methode der nachträglichen Säurebehandlung war also nichts Neues, und gewiss haben viele mit Anilinfarben arbeitende Forscher sich ihrer von Anfang an bedient; ich verweise nur auf die Empfehlungen von Friedländer, Weigert, Cornil und Baumgarten (Methylviolett), Dreschfeld (Eosin). Aber

es war ein neuer und glücklicher Gedanke von Ehrlich, die allzu universelle Neigung dieser Farben zur Tinction thierischer Gewebe dadurch einzuschränken, dass er dieselben von vornherein in einem Gemische ihrer besten, d. h. solcher Lösungsmittel verwandte, welche im Stande waren, sie auch nachträglich dem gefärbten Gewebe zu entziehen, vor Allem in Alkohol, Glycerin und Essigsäure. Schon im Hermann'schen Verfahren findet sich ein Ansatz hierzu, indem dieser Autor alkoholhaltige Lösungen bevorzugte. Ehrlich ging aber einen Schritt weiter und verwandte hauptsächlich Lösungen der Farbstoffe mit starkem Zusatz von Alkohol und Eisessig.

Bekanntlich stellte Ehrlich auf diesem Wege die Mastzellen direct isolirt dar. Bei Vorhandensein von 7—8 % Essigsäure machen nur noch die Körnchen der Mastzellen ihre Verwandtschaft zu den basischen Anilinfarbstoffen geltend, während schwächere essigsaure Lösungen noch Kernfärbung erzeugen. Für die Kerne kommen hier jene zwei oben genannten, sich widerstreitenden und zum Theil aufhebenden Eigenschaften in Betracht. Theils begünstigt die Essigsäure die Färbung der Kerne, indem sie dieselben zum Schrumpfen bringt (Fällung, Verdichtung des Nucleins), theils entfärbt sie durch ihre Farbstoff lösende Kraft; bei schwach essigsauren Farbstofflösungen überwiegt die erstere, bei stark sauren die letztere. Eine ganz entsprechende Methode, in welcher die Salpetersäure die Stelle der Essigsäure vertritt, ist die von mir angegebene, von Taenzer weiter ausgebildete Methode zur directen Färbung elastischer Fasern[1]). Diese Methode directer, specifischer Färbung (ohne den Umweg der Entfärbung) durch Beschränkung der Färbekraft vermittelst farbenlösender Zusätze zur Farbflotte hat späterhin, speciell für die Bakterien, nicht die verdiente, allgemeine Beachtung gefunden. Ehrlich selbst färbte Kokken der Endometritis ulcerosa und Gonokokken auf diese Weise. Die wenigen Versuche in dieser Richtung aus späterer Zeit will ich hier gleich anreihen. Dahin gehört der Vorschlag von Rindfleisch (56), die Tuberkelbacillen in einer

1) Ueber die Unna'sche Färbungsmethode der elastischen Fasern. (Monatsh. f. prakt. Derm. Bd. VI. 1887. No. 9.)

Mischung von Wasser, Alkohol und Salpetersäure zu gleichen Theilen mit Zusatz von Fuchsin anzufärben. Weiterhin die Methode Friedländer's, die Kapselkokken der Pneumonie zu färben. Gram (31) giebt für dieselbe folgende Vorschrift: Fuchsin 1,0, Acet. glaciale 2,0, Alkohol 5,0, Aq. dest. 100,0, mit nachfolgender Abspülung in Alkohol und Essig, Hueppe (Die Methoden der Bakterienforschung. 2. Aufl. 1886) — etwas später — die folgende an: eine spirituös-wässrige Lösung von Gentianaviolett mit Zusatz von 6—7 % Essigsäure. Sodann gehört hierher der Versuch Ziehl's (74), die Tuberkelbacillen in mit Essig angesäuerten Methylviolettlösungen zu färben. Endlich hat neuerdings Kühne (44) es ebenfalls vortheilhaft gefunden, die Lösung von Gentianaviolett in seiner Modification der Gram'schen Methode etwas anzusäuern.

Auch die nächsten Fortschritte in der Tinctionslehre mittels Anilinfarben, welche der Bakteriologie zu Gute kommen, sind noch rein auf allgemeinem histologischen Gebiete gemacht worden; sie finden sich in Ehrlich's (11, 12) allgemein bekannten Untersuchungen über die specifischen Granulationen der weissen Blutkörperchen niedergelegt. Bis dahin hatten Viele die Anilinfarben für eine ziemlich einheitliche Gruppe von Farbstoffen gehalten, welche wohl erhebliche Differenzen, aber nur graduelle, in ihrer Verwandtschaft zu den Bakterien erkennen liessen. Ehrlich lehrte dagegen zum ersten Male durchgehende, tinctorielle Unterschiede unter den Anilinfarben kennen, welche, da sie chemischen Differenzen unter ihnen entsprachen, auch bestimmte Formelemente histochemisch zu charakterisiren geeignet waren. Er theilte die Farbstoffe im Allgemeinen in basische und saure, indem er hier von dem gewöhnlichen Sprachgebrauche der Chemiker abwich. Unter basischen Pigmenten versteht Ehrlich solche, deren färbende Componente eine Basis, unter sauren Pigmenten die, deren färbende Componente eine Säure ist. Dabei sind in den meisten Fällen sowohl die basischen wie die sauren Farbstoffe nach gewöhnlichem chemischen Sprachgebrauch neutrale Körper, Salze, durch Hinzutreten einer Säure oder einer Basis zum Pigmente entstanden. Nur dann wäre bei dieser Eintheilung der alte Sprachgebrauch in gewissem Sinne aufrecht erhalten, wenn jedes Mal beim Färben sich die Farbe wieder in

ihre Componenten zerlegen würde und nur das eigentliche freie Pigment sich mit dem Gewebe verbände; wenn also beispielsweise bei der Fuchsinfärbung das salzsaure Rosanilin zerfiele und nur die freie Rosanilinbase an das Gewebe träte, die Salzsäure aber frei würde. Sehr wahrscheinlich ist dieses aber der Regel nach nicht der Fall; der neutrale Körper des Pigments tritt vielmehr mit den Geweben nach Art der Doppelsalzbildung als Ganzes zusammen.

Dieser neue Sinn der Ehrlich'schen Nomenclatur verdient um so mehr hervorgehoben zu werden, als wir bereits gewohnt sind, einzelnen Gewebsbestandtheilen eine verschiedene Reaction in wirklich chemischem Sinne zuzuschreiben. So verhält sich dem Lakmus gegenüber der Kern zum Protoplasma wie eine Base zur Säure. Die Vermuthung würde also nahe liegen, dass diese Reactionen der Gewebe sich den Ehrlich'schen Farbclassen gegenüber bewährten, während sie gar nichts mit dieser Eintheilung zu thun haben und auch thatsächlich gerade der basische Kern die „basischen" Farbstoffe, das Protoplasma die „sauren" Farbstoffe vorzugsweise festhält und nicht umgekehrt, wie man glauben sollte. Dasselbe haben wir in Betreff der „neutralen" Pigmente Ehrlich's zu bemerken, welche durch Vereinigung eines „basischen" und eines „sauren" Farbstoffs entstehen und welche ebenfalls höchst wahrscheinlich Doppelsalze darstellen. Ihre „Neutralität" bedeutet also nicht die Sättigung einer Farbbase mit einer Farbsäure im chemischen Sinne, sondern lediglich die Neutralisation in tinctorieller Beziehung. Mit diesem ausdrücklichen Vorbehalt begrüssen wir die Namen: basische und saure Farbstoffe, die sich ohnedies als kurze, rein tinctorielle Bezeichnungen schon eingeführt haben, als Ausdruck eines sachlichen, bedeutenden Fortschritts. Für die Auffassung des Färbeprocesses als eines chemischen, von physikalischen Umständen wohl beeinflussten, aber in letzter Instanz unabhängigen Vorgangs ist die Ehrlich'sche Arbeit grundlegend gewesen. Sie war es, welche allen Mikroskopikern die Ueberzeugung beibrachte, dass die tinctorielle Methode durch emsiges Fortarbeiten auf diesem neuen Wege aus dem Stadium der reinen Empirie, des planlosen Umhertastens zu einer mit der Chemie Hand in Hand gehenden Wissen-

schaft, zur tinctoriellen Mikrochemie heranreifen würde. In das Chaos der sich täglich mehrenden Anilinfarben war zugleich der Anfang einer Ordnung gebracht. Die engeren, von Ehrlich unterschiedenen Gruppen besassen doch schon einige gemeinsame Merkmale in ihrem Verhalten gegenüber dem Gewebe. So war nicht nur mit einem Male die so lange angezweifelte Möglichkeit einer zielbewussten Farbenanalyse der Gewebe zur Thatsache geworden, es waren auch bereits die Wege gewiesen, die nächsten Aufgaben für die Zukunft abgesteckt.

Sehen wir von diesem principiellen Fortschritt ab, so ist die Ehrlich'sche Arbeit für unsern Zweck noch bemerkenswerth durch zwei praktische Neuerungen. Erstlich führte Ehrlich bei dieser Gelegenheit die Erhitzung bis auf 120—130° als beste Conservirung und Fixirung der Formelemente des Blutes ein, eine Methode, welche bald darauf in Koch's Händen für die Bakteriologie so fruchtbar werden sollte. Und weiter verwandte Ehrlich zum ersten Male Gemische verschiedener Anilinfarben von vorher genau bestimmten, tinctoriellen Eigenschaften zu einer Farbenanalyse des Blutes, die an Schärfe der Reaction und Sicherheit des Resultats nichts zu wünschen übrig liess. Diese Methode der einzeitigen polychromatischen Färbung mit zweckmässig componirten Farbgemischen ist allerdings bisher wenig auf Bakteriengemische und Bakterien enthaltende Gewebe angewandt worden; es ist aber Grund, anzunehmen, dass diese Methode auch auf bakteriologischem Gebiete brauchbare Resultate zu liefern im Stande ist.

Hiermit verlassen wir die rein histologischen Arbeiten, welche auf die Entwicklung der bakteriellen Tinctionslehre von bedeutendem Einfluss gewesen sind, um uns den Arbeiten der Bakteriologen selbst zuzuwenden. Wir müssen da allerdings einige Jahre zurückkehren, etwa auf den Zeitpunkt der ersten Ehrlich'schen Arbeit.

Weigert (67) hat zuerst (1875) neben anderen färbenden Mitteln (Hämatoxylin, saurem Carmin) die Anilinfarben zur Tinction von Zoogloeahaufen empfohlen und erkannt, dass gewisse Bacillen, welche durch Hämatoxylin etc. nicht färbbar waren, sich mit Anilinfarben tingiren liessen. Dieser Forscher war

auch der Erste, welcher isolirte Färbungen von Bakterien in Schnitten mittels Hämatoxylin herstellte, deren diagnostischen Werth hervorhob und erkannte. Aber in diesen, für die Bakterienkunde ihrerzeit sehr wichtigen Neuerungen lagen keine tinctoriellen Fortschritte. Die tinctorielle Isolirung von Bakterien wurde nach alter Weise mittelst Kalilauge und Essigsäure bewirkt und eventuell auch durch nachträgliche Contrastfärbung verstärkt.

Zwei Jahre später (1877) schrieb Koch in seiner Arbeit: Untersuchungen über Bakterien (38):

> Die Bakterien nehmen die Anilinfarben mit einer solchen Sicherheit, so schnell und so reichlich auf, dass man diese Farben als Reagens zur Unterscheidung der Bakterien von krystallinischen und amorphen Niederschlägen, auch von feinsten Fetttröpfchen und anderen kleinsten Körpern benützen kann.

Hiermit waren ein für alle Mal die Anilinfarben als bequemstes und universellstes Färbemittel für Bakterien gekennzeichnet, und seitdem sind keine anderen Farben mehr für diesen Zweck empfohlen worden. In der Eintrocknung des Gewebssaftes zum Zwecke mechanischer Isolirung der Bakterien, in der Einführung der Photographie als eines diagnostischen Hülfsmittels (38), ferner in der Empfehlung des Abbe'schen Beleuchtungsapparates behufs optischer Isolirung der gefärbten Mikroorganismen (39) hat Koch uns mit ungemein wichtigen Verbesserungen beschenkt, welche in dem kurzen Zeitraum eines Jahres (1877—78) die Diagnose der Bakterien aus einer äusserst schwierigen, hart umstrittenen, mit vielen Fehlerquellen behafteten zu einer relativ leichten, sicheren, allgemein anerkannten machten. Speciell in der Tinctionstechnik waren aber keine Fortschritte zu verzeichnen. Koch (39) bediente sich für Schnitte noch zunächst des von Weigert angegebenen Verfahrens der Ueberfärbung in wässriger Lösung von Fuchsin, Methylviolett, kurzer Entfärbung in schwacher Essigsäure und Entwässerung in Alkohol, während ihm bei Saftpräparaten die einfache directe Färbung und Abspülung in Wasser genügte (38).

Neu war die von Koch sehr gelobte, aber nicht — wie es scheint — weiter verfolgte Methode der Entfärbung mittels einer schwachen Lösung von kohlensaurem Kali. Dieselbe soll die

Färbung des thierischen Gewebes (auch die der Kern- und Mastzellen) ganz auslöschen und also etwa dasselbe leisten, wie später die Gram'sche Methode. Mir scheint, dass dieses Verfahren zu bald aufgegeben wurde.

Die nächsten Arbeiten von Weigert und Koch, welche auf unseren Gegenstand Bezug haben, erschienen fast gleichzeitig zwei Jahre später. In beiden macht sich schon deutlich der Einfluss der Ehrlich'schen Arbeiten geltend. Weigert (68) adoptirt die Eintheilung in basische und saure Farbstoffe und erklärt ganz allgemein nur die „basischen" Pigmente nach zweckmässiger Entfärbung — geeignet zur isolirten Darstellung der Bakterien in Schnitten. Die „basischen Anilinfarben" sind also an die Stelle der „Kernfärbemittel" getreten. Die Methodik ist auch hier noch die alte: Ueberfärbung in wässriger Lösung, Entfärbung in Alkohol oder schwacher Essigsäure und Alkohol, Nelkenöl, Balsam. Weigert neigt jedoch in dieser Abhandlung mehr zur einfachen Alkoholentfärbung (Hermann-Flemming) ohne Anwendung irgend einer Säure. Kerne und Bakterien bleiben dann gefärbt, selbst wenn die Schnitte in Alkohol über 1 Stunde, in Nelkenöl über 2 Stunden, in Wasser Tage lang verweilen. Nur in Bezug auf die Contrastfärbung müssen wir einen entschiedenen Fortschritt constatiren, indem Weigert dieselbe zu einer nachträglichen Differenzirung zwischen Kernen und Bakterien benutzt. Eine Gegenfärbung mit essighaltendem Pikrocarmin (nach Färbung mittelst Gentianavioletts) verwandelt nämlich das Blau der Kerne in Roth, ohne die Bakterien umzufärben. Es wurde hiermit das neue Princip der Differenzirung durch partielle Umfärbung in die Bakteriotechnik eingeführt.

In Parenthese sei übrigens hier daran erinnert, dass ein Jahr vorher (1880) bereits Westphal (72) eine Composition mittheilte, welche Carmin und einen violetten Anilinfarbstoff in saurer Lösung enthielt und die Kerne roth, Bakterien (neben Mastzellen) blauviolett färbte [1]). Die Wirkung dieser Färbung ist annähernd die

1) 100 ccm Carmin von Partsch-Grenacher (Carmini spur. 2, Aq. dest. 200, Alumin. 5 werden $^1/_4$ Stunde gekocht, filtrirt und mit Acid. carbol. 1 versetzt), 100 ccm Glycerin, 100 ccm stark dahliahaltiger Alkohol, 20 ccm Eisessig.

gleiche wie bei der Weigert'schen, das Princip aber das der einzeitigen, polychromatischen Färbung.

Weigert empfiehlt in dieser Abhandlung vor allen anderen Anilinfarbstoffen das Gentianaviolett — ein Pararosanilin im Gegensatz zu den Rosanilinen (Fuchsin, Dahlia, gewisse Methylvioletts) — wie auch schon Koch die blauen Sorten der Violetts (und damit unbewusst wohl die Pararosaniline vor den Rosanilinen) bevorzugt hatte. In der That bürgerte sich dieser neue, übrigens sehr variirende Farbstoff auch schon vor Gram's zweiter Empfehlung desselben rasch ein, offenbar, weil er der Entfärbung grösseren Widerstand leistet (echter färbt).

Seine derzeit fast ausschliessliche Benutzung mag auch Weigert veranlasst haben, sich mit der einfachen prolongirten Alkoholentfärbung zu begnügen und die Säuren als Entfärbungsmittel zu verlassen. Uebrigens war Weigert weit entfernt, zu glauben, das Gentianaviolett vermöchte alle anderen Farbstoffe zu verdrängen; er betonte vielmehr, dass eine Reihe von Mikroorganismen (z. B. die Recurrensspirillen) sich gar nicht mittels desselben färben liessen. Aber gerade so, wie er vorher das Bismarckbraun für allgemein histologische Zwecke gleichsam allen andern Anilinfarben vorangesetzt hatte, so herrscht auch hier offenbar die Tendenz vor — welche in den Abhandlungen jener Jahre allgemein verbreitet zu finden ist — einem Farbstoffe, hier speciell dem Gentianaviolett, auf Kosten anderer Anilinfarbstoffe einen Vorrang einzuräumen. Diese Tendenz widerspricht offenbar den uns seit Ehrlich's Arbeiten sicher vorschwebenden Zielen, die chemischen Differenzen der Mikroorganismen einerseits und der Farbstoffe andererseits zur minutiösesten Farbenanalyse der ersteren zu benutzen. Die Differenzen auf beiden Seiten mögen noch so gering und uns bis jetzt verborgen sein, wir können nicht wissen, ob sie nicht in Zukunft zu scharfer Charakteristik der Organismen dienen können. Deshalb ist umgekehrt eine stets weiter getriebene Specialisirung unserer Färbemittel anzustreben, und die schablonenhafte Bevorzugung eines bestimmten wegen einer oder mehrerer guter Eigenschaften desselben kann nur dazu führen, unseren Sinn von den überall vor-

handenen tinctoriellen Eigenheiten der verschiedenen Bakterien abzulenken.

Auch Koch (40) empfiehlt, speciell für vorher erhitzte Trockenpräparate, das von Ehrlich eingeführte Methylenblau vor anderen Farbstoffen, widmet jedoch eine längere Auseinandersetzung gerade den soeben berührten, tinctoriellen Besonderheiten der Mikroorganismen. In diesem Aufsatz adoptirt Koch die Ehrlich'sche Methode der Erhitzung für Saftpräparate, indem er die von jenem benutzte Temperatur (120°—130°) nur wenige Minuten (nicht Stunden) einwirken liess. Hierdurch wurde die mechanische Fixirung der Eiweisskörper am Deckglase, welche Koch vorher durch langes Trocknen, durch Behandlung mit Chromsäure, chromsauren Salzen, Tannin, Alaun und Alkohol bewirkt hatte, momentan erzeugt und damit mechanisch die isolirte Färbung der Mikroorganismen erleichtert. Ebenfalls lehrte Koch hier den Kunstgriff, die Schnitte durch Erwärmung der Farblösung auf 40—50° rascher zu färben, welche später von Rindfleisch für den Tuberkelbacillus in die Praxis eingeführt wurde.

Das nächste Jahr (1882) brachte jene zwei Vorträge von Koch (24. März) (41) und Ehrlich (1. Mai) (3) in der Berliner physiologischen Gesellschaft, welche zunächst theoretisch und praktisch von einschneidendster Bedeutung für die Tuberculosefrage waren, aber auch weiterhin für die allgemeine Bakteriotechnik werthvolle Bereicherungen im Gefolge hatten. Koch theilte in seinem Vortrage: Ueber Tuberculose zunächst ein abgekürztes Verfahren mit, die Eiweissschicht des Sputums vor der Färbung durch Hitze zu fixiren. Die Deckgläschen werden dreimal langsam durch eine nicht leuchtende Gasflamme geführt. Diese Methode hat sich unter allen als die kürzeste und beste bewährt. Sodann schildert er ein Färbungsverfahren, welches zum ersten Male erlaubte, die Tuberkelbacillen vom Gewebe und von anderen Bakterien tinctoriell zu isoliren. Es beruht dasselbe auf dem schon von Weigert benutzten Princip der Differenzirung durch partielle Umfärbung. Saftpräparate und Schnitte wurden in einer mittelst Kali caust. (etwas stärker als 1‰) alkalisch gemachten, wässrigen Methylenblaulösung 24 Stunden hindurch gefärbt und das Blau aller Ge-

websbestandtheile, mit Ausnahme des der Tuberkelbacillen, sodann durch Behandlung mit Vesuvin in Braun umgewandelt.

Ehrlich (13) fand damals das Wesen dieser Koch'schen Methode in der Alkalescenz der angewandten Methylenblaulösung und ersetzte das von Koch gebrauchte Alkali (Kali caust.) durch ein anderes, das Anilin, von dem er, wie wir aus einer späteren Arbeit (15) erfahren, schon seit 1875 wusste, dass es als Zusatz die Färbung von reinem Methylviolett kräftiger und brillanter machte. Die mit diesen anilinhaltigen Lösungen gefärbten Präparate liessen sich nun nicht, wie die mit dem Koch'schen Alkali-Methylenblau gefärbten, durch Vesuvin umfärben, sondern vertrugen nicht bloss, ja, sie erforderten starke Säuren zur Entfärbung des thierischen Gewebes. Ehrlich ging daher zu immer stärkeren, schliesslich zur dreifach verdünnten, officinellen Salpetersäure über. In dieser Weise gelang es ihm, was Koch nicht gelungen war, die Tuberkelbacillen mit allen basischen Farbstoffen und selbst mit Bismarckbraun isolirt zu tingiren.

Wir sehen den Weg und die Bedeutung dieser Methode heute in anderen Factoren als ihr Autor zu jener Zeit, was natürlich ihrer Vorzüglichkeit in praktischer Hinsicht nicht im mindesten Eintrag thut und das sie begleitende Interesse wohl nur noch erhöht. Der Anilinzusatz war kein Ersatz für das Alkali, welches Koch zur Erhöhung der Tinctionskraft des Methylenblaus zugesetzt hatte, sondern wirkte — wie Ehrlich es selbst später bewies (15) und die meisten Histologen gewiss schon immer geglaubt hatten — als eine Beize, welche die Verbindung von Farbe und einzelnen Gewebstheilen, speciell Bakterien, vermittelt und verstärkt und dadurch deren Entfärbung erschwert. Das Anilin kann durch andere Beizen nicht alkalischer Art, unter Umständen sogar mit Vortheil, ersetzt werden. Das absolut Neue, Ueberraschende und auch jetzt noch die Tuberkelbacillen Auszeichnende war ihre abnorm hohe Säurefestigkeit. Ohne die von Ehrlich vorgeschlagene vorherige Beize wäre die besonders grosse Säurefestigkeit der gefärbten Tuberkelbacillen damals nicht gefunden worden, welche die Säurefestigkeit der meisten anderen Bacillen (ausser Leprabacillen) bei Weitem überragt.

Diese Eigenschaft ist es aber gewesen, welche mit einem Male den Nachweis der Tuberkelbacillen in allen Geweben zu einer höchst einfachen Procedur herabsetzte, dadurch ihren Uebergang aus der Hand des Forschers in die jedes praktischen Arztes ermöglichte und der Koch'schen Lehre von der Tuberculose einen gewaltigen Vorschub leistete. Koch hat diesen Umstand auch dankbar anerkannt, indem er seine eigne Methode, welche ihm persönlich die besten Dienste geleistet, in der Folge zu Gunsten der Ehrlich-schen aufgab.

Zum Schlusse seines Vortrags schliesst Ehrlich erstens, dass die Substanz des Tuberkelbacillus, da sie sich in allen basischen Anilinfarben färbt, nicht von der anderer Bacillen unterscheidet, und zweitens, dass die Säurefestigkeit deshalb auf der Undurchgängigkeit der Bacillenhülle für Säuren beruhen müsse. Der erste Schluss ist nicht bindend, da die Substanz verschiedener Bacillen, welche sich mit den gleichen Farben tingiren lassen, diese letzteren doch gegen Entfärbungsmittel sehr verschieden festhalten können, und deshalb ist die zweite Schlussfolgerung überhaupt nicht nöthig und — wie wir später sehen werden — auch wohl nicht haltbar.

Der Ruhm, durch seine Anilin-Salpetersäuremethode der Koch'schen Lehre grossen Vorschub geleistet zu haben, wird sich aber trotzdem stets an Ehrlich's Namen knüpfen, eine Genugthuung, welche dem emsigen Denker gewiss zu gönnen ist, dem wir so viele zwar weniger praktische und daher populäre, aber um so werthvollere und interessantere theoretische Funde und Untersuchungsmethoden verdanken.

Bekanntlich wurde aber die Ehrlich'sche Methode der Tuberkelbacillenfärbung erst durch weitere Verbesserungen Koch's (42) zu dem, was sie heute ist. Die wesentlichste war die Scheidung des Entfärbungsactes in zwei Theile, indem Koch nur einen ersten Antheil des Farbstoffes durch eine kurze Behandlung mit Salpetersäure, den Rest dagegen durch eine 10—15 Minuten lange mit 60—70%igem Alkohol entfärbte. Hierdurch gewann das ganze Verfahren an Sicherheit, und es war zugleich eine relativ bedeutende Alkoholfestigkeit der gefärbten Tuberkelbacillen dadurch erwiesen. Wir müssen die Koch-Ehrlich'sche Methode deshalb genauer

als Rosanilin[1])-Salpetersäure-Alkohol-Methode charakterisiren. Die übrigen Verbesserungen sind nur praktisch, nicht theoretisch von Belang. Es sind: die Normirung der Erhitzung von Deckgläsern auf ein gerade 3-maliges Durchziehen durch die Flamme, die Annahme der Weigert'schen Mischung (Anilinwasser 100 ccm, Methylviolettlösung 11 ccm), welcher Koch noch 10 ccm absoluten Alkohols zusetzte, die Abschwächung der Salpetersäure auf eine Lösung von 1:3—4 aq. dest. und die Contrastfärbung mittelst verdünnter Lösung von Vesuvin oder Methylenblau.

Für die Auffassung der Tuberkelbacillenstructur wichtig ist die von Koch constatirte Thatsache, dass die in Methylenblau gefärbten Bacillen stets schmäler und bei dichter Lagerung in den Culturen durch ungefärbte Zwischenräume getrennt sind, während dieselben nach einer Färbung mit Methylviolett oder Fuchsin eine grössere Breite besitzen, in den Culturen sich direct berühren und beim Verblassen sich zuerst eine farbschwache Hülle von einem noch stark gefärbten Centralfaden scheidet. Natürlich ist die durch diese Wahrnehmung sicher bewiesene Existenz einer tinctoriell sich abweichend verhaltenden Hülle nicht im geringsten eine Stütze für die damalige Theorie von Ehrlich, welche lediglich die Undurchdringlichkeit letzterer für Säuren zur alleinigen Basis hat.

Das von Koch beklagte inconstante und unberechenbare Verblassen der Präparate beruhte nach späteren Untersuchungen von mir (56) theils auf Resten von Säuren im Präparate, theils von noch unverharztem Oele in der Aufhellungsflüssigkeit und im Balsam.

Von einschneidender Wichtigkeit in theoretischer Beziehung war die bald nach den Mittheilungen von Koch und Ehrlich erscheinende Angabe von Ziehl (74), dass die Alkalescenz der Farbstofflösung doch keine nothwendige Vorbedingung zur Färbung des Tuberkelbacillus sei. Es gelang Ziehl, den letzteren auch in einer mit Essigsäure bis zur sauren Reaction (auf Lakmuspapier) versetzten Anilinwasser-Methylenviolettflotte zu färben.

---

1) „Rosanilin" = kurzer Ausdruck für basische Farbsalze der Rosanilin- und Pararosanilingruppe.

Praktisch kommt diese Modification ebensowenig in Betracht wie seine Darstellung des Tuberkelbacillus mittels Färbung in Methylengrün-Carbollösung und Entfärbung mittels Kalilauge. Gleich praktisch und theoretisch wichtig wurde aber Ziehl's Empfehlung der Carbolsäure (Resorcin, Pyrogallol etc.) an Stelle des Anilins. Der Autor enthält sich jedes positiven Erklärungsversuchs für den begünstigenden Einfluss der Carbolsäure und glaubt, dass die bisherigen Erfahrungen über die Färbung der Tuberkelbacillen erkennen liessen, dass dieselben die Farbstoffe nur langsam aufnähmen und ebenso schwer wieder abgäben, trotz Einwirkung von Säuren und Alkalien.

Sehr bald erhielt die von Ziehl gefundene Thatsache, dass eine alkalische Reaction der Farbflotte nicht nothwendig sei zur Färbung der Tuberkelbacillen, Bestätigung von verschiedenen Seiten. Lichtheim (46), ebenso de Giacomi (24) konnten die Färbung ohne Zusatz von Alkali oder Anilin bewirken. Petri (54) färbte sogar, wie Ziehl, die Bacillen in mit Essig angesäuerter Lösung und suchte durch nachträgliche Reaction mit Phenolphthalein darzuthun, dass die Bacillen aus alkalischen Lösungen nicht mehr Alkali aufnähmen als das umgebende thierische Gewebe. Auch Weigert (69) und B. Fränkel (18) schlossen sich später diesen Urtheilen an, und Baumgarten (3) widmete dem Nachweis, dass die Tuberkelbacillen in sputis und selbst in Schnitten durch einfach wässrige Lösungen in genügender Weise dargestellt werden können, eine eigene Studie. Am wichtigsten in theoretischer Beziehung war jedoch eine zweite Arbeit von Ziehl (75), in welcher er vorschlug, die Tuberkelbacillen durch Umfärbung von Fuchsinpräparaten mittels Methylenblau ohne Entfärbung in Salpetersäure darzustellen. In solchen Präparaten fand Ziehl meist die Tuberkelbacillen roth, die Kerne und andere Spaltpilze blau. Hin und wieder färbten sich aber auch einige Tuberkelbacillen in der Secundärfarbe, und Ziehl kam hierdurch als der Erste auf den Gedanken: „ob unter Umständen und in gewissen Perioden ihres Daseins die Tuberkelbacillen sich in ihrer Färbung etwa verschieden verhalten, und ob nicht auch bei dem Ehrlich'schen Verfahren einzelne Tuberkelbacillen durch die Salpetersäure entfärbt werden und des-

halb der Beobachtung entgehen", Fragen, welche später von Ehrlich selbst in bejahendem Sinn beantwortet wurden. Weiter macht Ziehl noch die von Ehrlich später ebenfalls bestätigte Angabe, dass salpetrige Säure (als Verunreinigung der Salpetersäure) die Bacillen entfärbt. Endlich finden wir noch in einer Nachschrift den äusserst wichtigen, weil elementaren und absolut beweisenden Versuch mitgetheilt über die Entfärbung der fuchsinrothen Bacillen mittels Salpetersäure. Die directe Beobachtung unter dem Mikroskop zeigte nämlich nicht nur die Vergilbung dieser Bacillen, also das Eindringen der Säure, sondern ergab auch eine erhebliche Differenz unter den Bacillenindividuen gegenüber der Salpetersäure. Alle diese Thatsachen wurden später von Ehrlich bestätigt und noch näher präcisirt.

Ehrlich (14) machte inzwischen den Versuch, die Undurchdringlichkeit der Bacillenhülle zu retten, indem er mittheilte, dass das doppeltschwefligsaure Natron, welches das Fuchsin in Leukofuchsin umwandelt und auf diese Weise das thierische, fuchsinrothe Gewebe entfärbt, die Bacillen intact lässt. Natürlich geht hieraus aber nicht im mindesten hervor, dass das schwefligsaure Salz nicht in den Bacillus eindringt, sondern nur, dass die Reduction des Pigments nach seiner Verbindung mit der Bacillensubstanz nicht mehr so leicht vor sicht geht. Denn nach sehr protrahirter Behandlung entfärben sich endlich auch die Bacillen hierbei.

In der Discussion (14) hielt weiter P. Guttmann die von Spina (57) etwa gleichzeitig mit Ziehl gemachte Beobachtung Ehrlich entgegen, wonach sich direct unter dem Mikroskop das Eindringen der Salpetersäure in die methylvioletten Bacillen beobachten lässt. Die Entgegnung von Ehrlich, dass Spina nur ungenügende Mengen von Salpetersäure mit dem Präparat in Berührung gebracht habe, trifft gar nicht den Kernpunkt der Hüllenbeschaffenheit. Denn wenn Bacillen und Umgebung sich gleichmässig durch die Salpetersäure entfärbten, so war dieselbe eben doch auch in die Bacillen eingedrungen. Es ist mir daher auch ganz unbegreiflich, dass Friedländer in derselben Sitzung die Angabe Spina's hiermit für erledigt ansehen konnte. Dieselbe wurde denn auch sogleich von Ziehl (76) in einem dritten Artikel in einwandsfreierer Weise wieder aufgenommen, auf den näher einzugehen wir uns er-

sparen können, da die sämmtlichen darin enthaltenen Momente, welche gegen die Undurchdringlichkeit der Bacillenhülle und gegen eine absolute Indifferenz der gefärbten Bacillen gegenüber der Salpetersäure sprechen, bereits im Bisherigen enthalten sind.

Hatte sich an die ersten Befunde von Ziehl über die Färbbarkeit des Tuberkelbacillus ohne Alkalien eine ganze Literatur über denselben Gegenstand angeschlossen, so lenkte die von demselben Autor herrührende Empfehlung des Phenols für die Folgezeit den Blick der Bakteriologen auf eine ganze Classe ähnlicher Stoffe, welche sämmtlich als Beizen für die Fixirung der Anilinfarben auf Bakterien dienen können. B. Fränkel (18) empfahl das Ortho-Toluidin, Prior (55) das Terpentinöl. Die weiteste Verbreitung neben dem Anilin und Phenol erwarb sich das Thymol (Brieger).

In einem weit später erschienenen Aufsatze: Beiträge zur Theorie der Bacillenfärbung (15) machte Ehrlich noch eine dritte Gruppe von Stoffen namhaft, die Aldehyde (Benzaldehyd, Salicyldehyd und Vanillin), welche die Rolle des Anilins, ähnlich den phenolartigen Körpern, übernehmen können. Diese wichtige Arbeit ist gleichsam die abschliessende Antwort auf den letzten, zwei Jahre vorhergehenden Artikel von Ziehl. Ehrlich bestätigte und ergänzte hierin eigentlich alle Gegenbefunde von Ziehl, suchte aber durch Hinzuziehung einer Hilfshypothese seine alte Hüllentheorie trotzdem aufrecht zu erhalten. Er fand zunächst, dass die Homologen des Anilins (Para-, Metatoluidin etc.) in tinctorieller Beziehung das Anilin ersetzen können, nicht aber die im Ammoniakreste substituirten Aniline, und zwar, wie Ehrlich annimmt, weil durch diese Substitution die Basicität des Anilins in hohem Grade herabgesetzt werde. Allerdings zeigte es sich aber weiter, dass Verbindungen, die noch alkalischer als das Anilin sind (wie Toluylendiamin und Dimethylparaphenylendiamin), dasselbe tinctoriell auch nicht ersetzen können. Dagegen erhielt Ehrlich wiederum gute Resultate mit oben genannten Aldehyden. Seine ursprüngliche Hypothese, dass die basische Beschaffenheit des Anilins die Färbung des Tuberkelbacillus verursache, giebt er deshalb im weiteren Verlauf der Arbeit auch definitiv auf und sieht sich nach einer neuen, für die drei Gruppen der Basen,

Phenole und Aldehyde gleichmässig gültigen Erklärung um. Eine solche findet er in der allen bezüglichen wirksamen Körpern (Beizen Ref.) zukommenden Eigenschaft, mit gelösten Farbsalzen eine im Wasser unlösliche, ölig sich abscheidende Verbindung einzugehen, die sich als solche mit dem Gewebe vereinigt.

Dass das Anilin die Verbindung des Gewebes nicht mit den Farbbasen, sondern nur mit den unzersetzten Farbsalzen vermittellt, bewies Ehrlich auf folgende Weise: Erstens genügt die Basicität des Anilins überhaupt nicht, um die Rosanilinsalze zu zersetzen: und zweitens lassen sich solche Farbsalze, wie Methylgrün, die mit Carbolsäure versetzt zur Färbung dienlich sind, mit Anilin eine solche aber wegen der theilweisen Abscheidung der ungefärbten Farbbase nicht geben, in derartigen, mit Anilin-Methylgrün behandelten Präparaten als essigsaures Salz auch nicht reconstruiren und haben folglich nur den unzersetzten Antheil an Farbsalz und nicht auch die freie Base an das Gewebe abgegeben.

Diesen sehr werthvollen Befunden gegenüber halten wir die in dem ersten Abschnitt enthaltenen Schlüsse auf die Constitution des Tuberkelbacillus für durchaus nicht bindend. Aus der Resistenz der mit Anilinfuchsin gefärbten eiförmigen Körper in den Bacillen gegen Natriumbisulfit geht durchaus nicht hervor, dass diese für Natriumbisulfit undurchdringlich sind, sondern lediglich, dass ihre Substanz zum Fuchsin eine höhere Verwandtschaft besitzt als die übrige Masse des Bacillus. Dass weiter die mit Anilin-Methylenblau oder Anilin-Saffranin gefärbten Bacillen schmäler sind als die mit Anilin-Fuchsin gefärbten (so schmal wie nach dem ursprünglichen Koch'schen Verfahren), beweist durchaus nicht, dass hier nicht die Anilinverbindung des Methylenblaus, resp. Saffranins vorliege, sondern lässt ebenso gut die Deutung zu, dass Methylenblau und Saffranin überhaupt nur unter günstigen Umständen in einem innern Theil des Bacillus fixirt bleiben, aber nie zugleich in der von Anilinfuchsin mitgefärbten Hülle. Ehrlich bezieht den Nutzen des Anilins (Phenols etc.) bei diesen Farbstoffen, in deren wässerigen Lösungen sie keine Trübung erzeugen, lediglich darauf, dass sie die Bacillenhülle für den Farbstoff durchgängig machen, während sie

bei allen Farbstoffen, welche mit jenen Beizen Trübungen und Niederschläge ergeben, noch zweitens dadurch wirken sollen, dass sie sich mit den Farbstoffen in dem Bacillus zu Doppelverbindungen paaren.

So einleuchtend diese letztere Wirkung des Anilins, Phenols etc. ist, und so gut diese Hypothese mit allen sonstigen neueren Ergebnissen über histologische Färbung übereinstimmt (s. weiter unten), so überflüssig und gezwungen erscheint die Annahme, dass alle jene verschiedenen Stoffe (Basen, Phenole, Aldehyde) gerade die eine bestimmte Hülle des Tuberkelbacillus für den Eintritt des Farbstoffs (weshalb denn übrigens nicht auch für dessen Austritt?) gleichmässig durchgängig machen sollen. Unnöthig ist sie, da die auch von Ehrlich sonst durchaus anerkannte, chemische Theorie der Färbung, die Annahme, dass alle Gewebe, also auch die Bestandtheile der Bacillen, eine specifische, qualitativ verschiedene Verwandtschaft zu den Farbstoffen besitzen, sämmtliche Differenzen des Tuberkelbacillus gegenüber anderen Bakterien und ebenso alle Unterschiede zwischen den verschiedenen Farbstoffen den Bestandtheilen des Tuberkelbacillus gegenüber zu erklären im Stande ist. Gezwungen erscheint sie besonders im Hinblick darauf, dass diese Hüllenhypothese immer in ganz abstracter Weise mit einer Hüllenmembran operirt, die den Tuberkelbacillus auszeichnen soll, während nicht bloss die meisten, vielleicht alle Bakterien eine besondere Hüllsubstanz besitzen, sondern viele sogar mehrere und darunter nach neueren Untersuchungen nicht nur der dem Tuberkelbacillus sehr nahestehende Leprabacillus, sondern auch der erstere selbst [1]).

Schliesslich muss ich noch die Angaben zweier Autoren in Schutz nehmen, welche bei Ehrlich offenbar nicht zu ihrem Rechte kommen. Zunächst ist die Empfehlung der ammoniakalischen Gentianaviolettlösung durch Weigert nicht deshalb ein „Rückschritt", weil nothwendigerweise Gentianaviolett stets verunreinigt und zwar nur ein verunreinigtes Methylviolett ist, sondern im Allgemeinen sollen wir allerdings zum Zwecke genauen Arbeitens nur chemisch reine Farbstoffe direct aus den Laboratorien und nicht die im Handel befindlichen, der Mode unterworfenen, vorsätzlich

1) s. Centralblatt f. Bakteriologie u. Parasitenkunde. Bd. II. 1887. p. 24.

gemischten und verunreinigten Präparate beziehen. In diesem besonderen Falle betrifft aber die Empfehlung Weigert's ein Pararosanilin, welches von den meisten früher benutzten Methylviolettmarken des Handels nicht durch seine Unreinheit, sondern seine chemische Constitution unterschieden ist. In der Folge erwiesen sich die Pararosanilina (in den Jodmethoden) als wirklich ganz hervorragend nützliche Farbstoffe, und deshalb lag in Weigert's Empfehlung implicite ein — wenn auch von ihm nur empirisch gefundener — Fortschritt. Sodann ist es nicht richtig, wenn Ehrlich Ziehl vorwirft, er habe, „durch den Namen Carbolsäure verlockt", dies als einen Beweis der Säuredurchdringlichkeit gegen die Hüllentheorie ins Feld geführt. Ziehl sagt vielmehr ausdrücklich, dass der Ehrlich'sche Satz, die Umhüllungsschicht der Tuberkelbacillen sei für Farbstoffe nur unter dem Einflusse von Alkalien durchgängig, „wenigstens für eine (durch Essig) saure Lösung von Methylviolett" sicher falsch ist, und wendet sich erst dann zur Einführung der Carbolsäure, des Resorcins und Pyrogallols.

Den Schlusssatz von Ehrlich's erstem Capitel, die Rolle des Anilins — und seiner Ersatzmittel — sei eine doppelte, einmal mache es die Bacillenhülle durchgängig, andererseits verbinde es sich mit dem Pigment zu der für die Brillanz der Färbung nöthigen Doppelverbindung — können wir also nur in seinem zweiten Theile, nicht in seinem ersten gut heissen und für bewiesen erachten.

Der zweite Abschnitt von Ehrlich's Arbeit beschäftigt sich direct mit jener hypothetischen Säureundurchdringlichkeit und versucht, dieselbe als eine wechselnde und zwar mit dem Alter des Bacillus zunehmende aufrecht zu halten, da sie als eine absolute und allen Individuen gleichmässig zukommende nicht mehr haltbar war, nachdem Ziehl unter dem Mikroskop das Eindringen der Säure direct beobachtet hatte. Entkleiden wir den Ehrlich'schen Befund der theoretischen, subjectiven Umhüllung, so bleibt uns als Kern die wichtige Thatsache, dass unter einer gegebenen Menge von Tuberkelbacillen einige sich bereits mit neutralen Anilinfarblösungen in der Kälte, andere sogar in schwach angesäuerten färben, während man alle nur in heisser, wässriger oder alkali-

sirter Lösung tingirt erhält. Ehrlich zeigte, dass man diese Differenz durch eine Umfärbung genau feststellen kann, indem man zur primären Färbung ein Pigment von an und für sich geringerer Tinctionskraft (Methylenblau) in heisser oder alkalischer Lösung, zur secundären ein stärkeres Pigment (z. B. Fuchsin) in kalter wässeriger Lösung anwendet. Diejenigen Bacillen, welche sich nun überhaupt mit Fuchsin in kalter wässeriger Lösung verbinden können, zeigen sich dann nach entsprechender Entfärbung umgefärbt (roth), die anderen nicht (blau). Auch bei umgekehrter Reihenfolge der Proceduren ergeben sich dieselben Differenzen [1]).

Die Verschiedenheit der Tinctionsfähigkeit der einzelnen Bacillen je nach dem sauren, neutralen oder basischen Charakter der Flotte während der Färbung findet nach Ehrlich weiter eine Analogie in der Verschiedenheit der Resistenzfähigkeit der bereits gefärbten Bacillenindividuen gegen ein und dieselbe Säure. Ein Theil der Bacillen vergilbt nämlich in starker Salpetersäure schon nach 2 Minuten, ein anderer viel später — bis 30 Minuten. Man kann sehr wohl mit Ehrlich annehmen, dass diese individuellen Differenzen auf das Alter der Bacillenindividuen zurückzuführen sind, ohne dass man im geringsten gezwungen ist, die weitere Folgerung Ehrlich's zuzugeben, dass diese Differenzen bei der Färbung und Entfärbung „nur in der Weise zu erklären seien, dass man der Hülle verschiedene Eigenschaften znschreibt." Um nicht zu sehr ins Breite zu gehen, stelle ich die 3 Sätze der neuen, gegenüber Ziehl's Kritik modificirten Hüllentheorie Ehrlich's und daneben die anderen aus der chemischen Theorie sich ergehenden Fassungen, resp. Erklärungen derselben Thatsachen einander gegenüber.

1) Ehrlich betont bei dieser Gelegenheit noch mit Recht, dass wir jede neue Färbemethode des Tuberkelbacillus nach dem Princip der Umfärbung gegenüber den bewährten Methoden auf ihre Güte prüfen sollten. Gewiss ist es nicht nur möglich, sondern in Zukunft sogar sehr zu wünschen, dass für jeden Mikroorganismus die Farbstoffe nach ihrer Verwandtschaft zu demselben in eine Reihe gebracht werden. Es wird sich dann wohl herausstellen, dass diese Reihen nicht, wie viele Forscher heute noch annehmen, für die verschiedenen Bakterien annähernd die gleichen sind.

Ehrlich's physikalische Auffassung.	Ebenso gut mögliche chemische Auffassung.
1) Die Bacillenhülle wird durch den Einfluss von Alkalien, Phenol, Anilin durchgängiger.	1) Die Bacillensubstanz verbindet sich leichter und fester mit Farbstoffen unter gleichzeitiger Einwirkung von Alkalien, Phenol, Anilin etc.
2) Starke Mineralsäuren durchdringen die Bacillenhülle relativ langsam.	2) Das einsäurige Farbsalz verbindet sich mit überschüssiger Säure zum mehrsäurigen Farbsalz leichter im thierischen Gewebe, wo es überhaupt lockerer gebunden ist, als in der Bacillensubstanz, wo es fester gebunden ist.
3) Die unter dem Einfluss der Säure stehende Membran ist für complexere Molecüle fast vollkommen undurchgängig.	3) Die Verbindung: Gewebe + einsäuriges Farbsalz + Säure giebt leicht die locker gebundene überschüssige Säure, aber nur schwer auch das fest gebundene einsäurige Pigment an Lösungsmittel (Wasser, Alkohol) wieder ab.

Zum Schlusse dieses zweiten Abschnitts zieht Ehrlich eine Parallele zwischen den Hornzellen der Oberhaut und der Hülle der Tuberkelbacillen, welche bekanntlich etwa dieselbe Säurefestigkeit in gefärbtem Zustande besitzen.

„Weiterhin scheinen auch die Resorptionsverhältnisse beider Membranen ähnlich zu sein, indem gerade die Lösungen, welche die Hülle der Bakterien durchdringlich machen, auch von der Haut in wässerigen Lösungen leicht resorbirt werden, wovon man sich leicht beim Arbeiten mit Carbol- und Anilinlösungen überzeugen kann. Auch die färbungsbegünstigende Eigenschaft der Alkalien findet an der Haut ihr Analogon, indem diese für alkalisch reagirende Stoffe, z. B. Seifen, zugänglicher ist als für reines Wasser oder gar saure Flüssigkeiten. Wir dürfen vielleicht, gestützt auf diese Uebereinstimmung, die specifischen Eigenschaften des Bacillus darauf zurückführen, dass seine Hülle ebenso wie die Epidermis schwer von wässerigen Lösungen benetzt werde und somit ein Diffusionsverkehr zwischen dem Inhalt und der Umgebung nicht leicht erfolge."

Die Durchdringlichkeit der Hornschicht für Phenol, Anilin etc. erklärt sich ja leicht durch deren Flüchtigkeit und beschränkt sich durchaus nicht auf die Hornsubstanz. Die leichte Benetzbarkeit und Durchlässigkeit (unter Aufquellung) der Hornschicht würde, wollte man die Analogie strict durchführen, es nothwendig machen,

eine Fettsubstanz auch in den Bacillen vorauszusetzen. Hiergegen dürfte doch wohl daran zu erinnern sein, dass die Hornsubstanz auch sämmtliche Säuren (ohne dabei aufzuquellen) leicht durchlässt, besonders in concentrirter Form, wie wir sie in der Tinctionstechnik verwenden, und nicht bloss die mineralischen, sondern auch die organischen: Milchsäure, Essigsäure und die säureähnlichen Phenolderivate (Salicylsäure), und weiter, dass die Hornschicht sich äusserst leicht und echt in sauren Farbstoffen (Pikrinsäure, Nitrokörpern und Azorfarbstoffen, Sulphosäuren des Rosanilins) färbt, kaum weniger leicht als in basischen.

Trotz dieser Divergenzen wäre es erwünscht gewesen, wenn Ehrlich die Analogie zwischen den tinctoriellen Eigenschaften des Tuberkelbacillus und der Hornschicht bei dieser Gelegenheit in histologischer Beziehung genauer durchgeführt hätte. Nicht die Hornschicht als Membran, sondern die einzelne Hornzelle entspricht natürlich dem einzelnen Tuberkelbacillus, denn sie zeigt isolirt dieselbe Säurefestigkeit wie dieser. Nun hatte ich (59) bereits vor 12 Jahren nachgewiesen, dass die Hornschicht als Ganzes eine Praedilection für einen basischen Farbstoff (Dahlia) besitzt, dass gewisse Partieen derselben sich durch successive Entfärbung mitelst Alkohol und Benzin isolirt darstellen lassen und das innerhalb derselben die einzelnen Zellen mit farblosen Rändern aneinanderstossen, gerade wie Koch in mit Methylenblau gefärbten Kulturen die Tuberkelbacillen mit farblosen Rändern aneinander stossen sah. Diese Thatsache ist wohl von Ehrlich übersehen worden. Später konnte ich mit Kühne's Verdauungsmethode nachweisen, dass nur der äusserste Mantel der Hornzellen verhornt sei (60); also besteht an den gefärbten Hornzellen gerade die ungefärbte, äussere Partie allein aus Hornsubstanz und nur das unverhornte Innere ist nach der Entfärbung noch gefärbt. Die basisch gefärbte, maximal entfärbte, säurefeste Hornzelle, deren Hornmantel die Farbe abgegeben hat, ist das genaueste Prototyp des methylenblau gefärbten Tuberkelbacillus mit farblosem Aussensaum. Hier, an dieser Form des gefärbten Bacillus wäre überhaupt Ehrlich's Hüllentheorie allein discutirbar: hier könnte die Frage aufgeworfen werden — ebenso wie bei der Hornzelle — ob

vielleicht die äussere, ungefärbte Hülle durch die Säure so verändert sei, dass der complexer gebaute Farbstoff nicht wieder nach aussen diffundirte. Und hier wäre — beim Bacillus ebensowohl wie bei der Hornzelle — nur die eine Antwort berechtigt: nein; denn der farblose Saum der Hornzelle tritt schon bei einfacher Alkohol-Benzolentfärbung, der des methylenblau oder saffraninroth gefärbten Tuberkelbacillus ebenfalls schon bei Alkoholentfärbung auf. Hier ist die Differenz zwischen Kern und Hülle also sicher nur Ausdruck einer geringeren Fixation des Farbestoffes in der Hülle.

Dagegen ist bei den dickeren rosanilin und pararosanilin gefärbten Bacillen, auf welche die Hüllentheorie von Ehrlich allein gestützt wurde, dieselbe geradezu logischerweise gar nicht discutirbar. Denn hier ist die Hülle eben selbst mit gefärbt. Und wenn der Inhalt desshalb den Farbstoff halten soll, weil die Hülle durch Säuren für ihn unpassirbar geworden ist, dann haben wir logischerweise zu fragen, weshalb bleibt denn die Hülle auch gefärbt? Wir müssen für die gefärbte Hülle wieder eine zweite äussere Umhüllung hypostasiren, welche das Gefärbtbleiben jener erklärt u. s. f.; d. h. wir gelangen auf die schiefe Ebene eines regressus in infinitum solange, bis wir eine äusserste, ungefärbte Hülle constatiren können. Es ist nach dem Gesagten ganz klar, dass wir — abstracte physikalische Vorstellungen beiseite gesetzt — für eine wirklich stichhaltige, zweite Ehrlich'sche Hüllentheorie in concreto zu verlangen haben: den histologischen Nachweis einer ungefärbt bleibenden Hülle, deren Entfärbung gerade nur durch dieselben Säuren hervorgerufen wird, welchen Ehrlich die gleichzeitige Fixation des Farbstoffs im Innern zuschreibt. Erst wenn dieser Nachweis wirklich geliefert ist, kann von einer physikalischen Theorie der Tuberkelbacillenfärbung gesprochen werden, welche sich der allgemeinen, für alle Gewebe geltenden, chemischen Theorie der Färbung ebenbürtig an die Seite stellt. Bis dahin ist die Hüllentheorie Ehrlich's auch in ihrem jetzigen Gewande nicht blos unnöthig, sondern vor allem ungenügend gestützt.

Ich habe es für nöthig gehalten, gerade an dieser Stelle noch

einmal auf den viel besprochenen Gegenstand zurückzukommen. Denn ich würde es geradezu — wie die Thatsachen heute liegen — für eine verlorene Zeit halten, wenn andere Forscher, durch Ehrlich's physikalische Theorie bestochen, für denselben Gegenstand oder ähnliche physikalische Erklärungen eintreten wollten, während die chemische Theorie so viele klare, wirklich lösbare und praktisch werthvolle Aufgaben an uns stellt.

Der dritte Abschnitt der kurzen, aber äusserst inhaltreichen Ehrlich'schen Abhandlung behandelt die Nachfärbung und giebt keine principiell neuen tinctoriellen Gesichtspunkte.

Mit dieser abschliessenden Arbeit Ehrlich's beschäftigen sich noch zwei neuere Abhandlungen von Gottstein (29) und mir (64), jene ausschliesslich, diese gelegentlich. Gottstein, indem er Ehrlich's Arbeit kurz referirt, betont, dass Ehrlich alle jene Thatsachen bestätigt, erweitert und präcisirt, welche von anderen Autoren gegen seine Erklärung der Thatsachen geltend gemacht worden, aber trotzdem an seiner allerdings modificirten Hüllentheorie festhält, welche an die Stelle eines quantitativen Unterschiedes zwischen Tuberkelbacillen und andern Bakterien (nach Ziehl u. A.) einen qualitativen statuire. Die Annahme von Ehrlich, dass das Anilin den Farbstoff im Gewebe des Bacillus stärker binde, werde „zur Erklärung des tinctoriellen Verhaltens erst unter Zuhülfenahme der Hypothese von der Hülle." Hierin thut aber Gottstein Ehrlich entschieden Unrecht. In der letzten Arbeit hat Ehrlich die Specifität der Hülle in qualitativem Sinne ganz fallen lassen und selbst zugegeben, dass durch jede Säurebehandlung gewisse Bacillenindividuen ganz entfärbt werden können, hält also nur noch an quantitativen Differenzen der Tuberkelbacillen gegenüber andern Bakterien bei der Säurebehandlung fest. Allerdings beruht die Ehrlich'sche Erklärung jetzt zum Theil auf der Annahme einer Anilin-Beize, zum Theil auf der einer Hüllenveränderung; aber nothwendig ist, wie ich hinlänglich gezeigt zu haben glaube, die zweite Stütze derselben nicht; es würde die Annahme einer Anilinbeize, verbunden mit der doch nothwendigen Annahme einer specifisch starken Verwandtschaft zu basischen Anilinfarben, vollauf genügen und ich kann in der

allerdings problemartischen Natur der Ehrlich'schen Hülle deshalb keinen Grund — wie Gottstein — finden, um auch die Annahme einer Anilinbeize durch eine bessere Hypothese ersetzen zu müssen. Jene beiden Annahmen Ehrlich's gehören eben durchaus nicht untrennbar zusammen. Gottstein findet nun die Rolle jener Zusätze (Anilin, Carbol) darin begründet, dass dieselben concentrirtere Farblösungen herzustellen gestatten als reines Wasser. Die Unterschiede zwischen einfach gefärbten und mit Anilin gefärbten Präparaten sind aber — und hier müssen wir Ehrlich Gottstein gegenüber durchaus Recht geben — durch diesen gewiss mit in Betracht kommenden Factor allein sicherlich nicht erklärt. Zunächst verhält sich die Lösungskraft reinen Wassers zu der des Carbol und Anilinwassers nur wie 1:2 (Gottstein); derartige geringe Intensitätsdifferenzen lassen sich aber sonst in der Tinctionstechnik leicht durch längere Dauer der Färbung, durch Erwärmen etc. überwinden. Man kann aber direct zeigen, dass die Zusätze wirklich die qualitativen Differenzen erzeugen, auf die Ehrlich Werth legt, die grössere Brillianz der Färbung und deren grössere Resistenz resp. Echtheit, wenn man eine beliebige, wässrige Lösung von Fuchsin in zwei Hälften theilt, die eine mit einigen Tropfen concentrirter Carbolsäure versetzt oder mit Anilin schüttelt und dann zu gleicher Zeit in derselben Temperatur benachbarte Schnitte desselben Tuberkel- oder Leprabacillen enthaltenden Gewebstückes in beiden Hälften ausfärbt. Man hat dann zwei Farbflotten von genau gleicher Concentration des Farbstoffs und doch treten die besprochenen Differenzen in der Färbung deutlich hervor. Ohne daher im Geringsten bestreiten zu wollen, dass manche der gebräuchlichen Zusätze (Beizen) durch die Möglichkeit der Anwendung concentrirterer Farbflotten die Färbung begünstigen, stellen wir uns in der theoretischen Auffassung des Anilins doch vollständig auf die Seite Ehrlich's und lassen demselben, im Gegensatz zu Gottstein, eine „specifische Bedeutung" zukommen.

Nach Elimination dieses Factors sieht Gottstein das Wesentliche der Tuberkelbacillenfärbung nur noch in ihrer variablen, aber stets hervorragenden „Resistenz gegen Säuren", erweitert aber diesen

Begriff zu dem der „Resistenz gegen alle entfärbenden Agentien", zu denen vor Allem die Salzlösungen gehören, worin wir ihm durchaus beistimmen, auch ohne uns — wie er — mit Gierke's physikalischer Deutung einverstanden zu erklären. Gottstein nimmt in Bezug auf die Hüllentheorie einen vermittelnden Standpunkt ein. Für bestimmte, amorphe, säurefeste Substanzen, wie Lanoin (28), Fettsäurekrystalle, Cholestearin (28), Mastzellenkörner (52) ist die Hüllentheorie nicht blos unnöthig, sondern sicher durch die einfache Verwandtschaft derselben zu den Farbstoffen zu ersetzen. Dagegen scheint Gottstein für gewisse Schimmelpilzsporen, Mucorsporen (54) die Hüllentheorie möglich, für die Smegmabacillen (1,37) und die auf Fett gezüchteten Bakterien (5) aber bereits erwiesen zu sein. Für uns ist die zweite Hüllentheorie Ehrlich's für die genannten Sporenarten und die Smegmabacillen ebenso unwahrscheinlich wie für die Tuberkelbacillen. Dagegen können wir nicht zugeben, dass selbst, wenn eine Fetthülle nicht fetthaltender Bakterien durch Bienstock und Gottstein erwiesen sein sollte, diese für Ehrlich's Hüllentheorie irgendwie zu verwerthen sei. Denn diese Gottstein'schen Fettbacillen würden dann nur in ihrer Fetthülle gefärbt werden; auf sie würde die erste Forderung Ehrlich's, dass die Säure zuerst die Hülle durchdränge, ebenso wenig passen, wie die zweite, dass der Farbstoff im Innern der Hülle nachher zurück bliebe. Diese Fetthülle Gottstein's wäre, weit entfernt, eine Stütze für Ehrlich's Hüllentheorie abzugeben, nicht anders zu betrachten, als wie jene amorphen Fettkörper der ersten Gruppe, mit dem einzigen Unterschiede, dass das Fett hier in Form einer Hülle ausgebreitet ist; denn sie wird ja als solche, nicht durch Vermittelung einer durch die Säure veränderten Hülle, gefärbt.

Die von mir in meiner Abhandlung über Rosanilin und Pararosaniline (pg. 64—70) vorgebrachten Gründe gegen die zweite Ehrlich'sche Hüllentheorie decken sich mit den hier bereits entwickelten Anschauungen, sodass wir nicht näher darauf einzugehen haben. Ich machte nur noch l. c. auf die Verwicklungen aufmerksam, welche entstehen, wenn man die Theorie, die für eine einheitliche Hülle aufgestellt sei, auf die complicirte Structur der

Bacillen wirklich anwenden wollte, wie wir sie jetzt genauer vom Lepra- und Tuberkelbacillus kennen.

Weniger als diese Erörterung principieller Fragen interessiren uns für unsere Zwecke die Versuche verschiedener Forscher, die Koch-Ehrlich'sche Methode praktisch zu verbessern. Dahin gehört die Einführung des Salzsäure haltigen Alkohols (1 HCl: 100 Alkohol von 70°) statt der HNO_3 durch Orth (52), die rapide und starke Erhitzung der Farbflotte nach Rindfleisch, die Vereinigung der Säureentfärbung und Contrastfärbung in einen Akt durch Mischung von Methylenblau, Vesuvin, Malachitgrün mit HNO_3 nach Fraenkel (18), die Darstellung ohne alle Beizen und Säuren durch Baumgarten (3).

Während die Koch-Ehrlich'sche Methode der Tuberkelbacillenfärbung durch die besprochenen Arbeiten mehr theoretisch geklärt als praktisch fortentwickelt wurde, sind nur wenige Arbeiten zu nennen, welche neue Methoden für die Färbung des Tuberkelbacillus aufzufinden streben. Hierher gehört die oben bereits erwähnte von Rindfleisch (56) angegebene Methode directer, isolirter Färbung in einer durch Salpetersäure abgeschwächten Farblösung. Ueber dieselbe ist später weiter nichts publicirt. Jedenfalls ermuntert diese Angabe, Farbflotten zur directen, isolirten Färbung nach den jetzt schon bekannten Eigenschaften des Tuberkelbacillus zu componiren. Gibbes (25) hingegen schlug eine Methode einzeitiger Doppelfärbung vor, welche von Fränkel (18) und Baumgarten (3) nachgeprüft wurde. Fränkel gelang dieses besser als Baumgarten; für zuverlässig in differential diagnostischer Beziehung konnten aber beide Forscher sie nicht erklären. Auch hier ist die von Gibbes angegebene Form der einzeitigen Doppelfärbungsmethode (eine concentrirte Lösung von 2 Theilen Fuchsin und 1 Theil Methylenblau in Anilinöl und absol. Alkohol) jedenfalls noch nicht die beste und bei zweckmässiger Auswahl im Farbenschatze wird sich auch auf diesem Wege gewiss noch eine zufriedenstellende Composition finden lassen.

Blicken wir einen Augenblick zurück auf die Summe von Arbeitskraft und Nachdenken, welche allein der Tuberkelbacillus

in den letzten 5 Jahren seit Mittheilung der Koch'schen Färbemethode in der Tinctionslehre hervorgerufen hat. Die schwerwiegende, pathologische Bedeutung desselben macht wohl das allgemeine Interesse und die Theilnahme so vieler Praktiker an dieser Arbeit begreiflich. Aber theoretisch wäre das Studium desselben nie so fruchtbar gewesen, wenn nicht Ehrlich gleich Anfangs jene problematische Hüllentheorie aufgestellt hätte. Die Polemik zwischen Ziehl und Ehrlich hat die Tinctionslehre im Allgemeinen sehr gefördert und wird für alle Zeit ein lehrreiches Beispiel bleiben, dass eine scharfsinnige Hypothese auch dann der Wissenschaft grossen Nutzen bringen kann, wenn sie sich später nicht als stichhaltig erweist.

Aber neben diesen Arbeiten, die sich an Koch's Entdeckung anschlossen, sind noch verschiedene andere Reihen zu verzeichnen, welche nicht minder bedeutsam für die Färbungslehre geworden sind. Unter diesen ist diejenige die wichtigste, welche mit der Arbeit von Gram (30) beginnt. Die Gram'sche Abhandlung steht durchaus auf eigenen Füssen, wenn sie sich auch äusserlich durch Verwendung der Ehrlich-Weigert'schen Anilin-Gentianalösung an die Tuberkelbacillenfärbung anlehnt, und bildet den Ausgangspunkt nicht bloss einer neuen, allgemeinen Methode der Bakterienfärbung (und Mitosenfärbung [1]), sondern auch einer allgemeinen Entfärbungsmethode für Anilinfarben. Gram brachte Schnitte und Deckgläschen aus Alkohol in die Anilin-Gentianalösung und von hier aus nicht direct in Alkohol resp. Säure, sondern erst in jodhaltige Jodkaliumlösung (1:2:300). Die hierdurch im ganzen Schnitte erzeugte Farbenverbindung, eine Doppelverbindung von Jod, Pararosanilin und dem Gewebe, lässt sich aus ihrer Verbindung mit dem thierischen Gewebe und selbst mit den Kernen relativ leicht durch Alkohol auswaschen, schwer dagegen aus der mit Schizomyceten und besonders aus der mit Kokken und kokkenähnlichen, in anderen Bakterien vorkommenden Gebilden. Ich muss hier von vornherein darauf aufmerksam machen, dass schon die ersten Versuche von Gram selbst die Neigung dieser Methode, Kokken zur Anschauung zu bringen,

1) In diesem Falle hat die allgemeine Histologie wieder einen Fortschritt der Bakteriotechnik zu verdanken.

verriethen. Es gelang Gram, die Kokken der Pneumonie, die der Pyämie, der Osteomyelitis, verschiedener Eiterungen, des Erysipels zur Anschauung zu bringen, aber nicht die Typhusbacillen. Später fand sich auch, dass der Rotzbacillus, der Kommabacillus der Cholera und die Recurrensspirochaete nicht durch Gram's Methode darstellbar sind. Andererseits hielten auch die Tuberkel- und Milzbrandbacillen der Entfärbung stand. Aber Gram betonte bereits, dass die Tuberkelbacillen, sowohl nach seiner als nach der Koch-Ehrlich'schen Methode, sehr häufig nicht homogene Stäbchen darstellen, sondern helle Räume enthalten, sodass ein gegliedertes Aussehen entsteht und sie zuweilen fast als Kokkenketten erscheinen. Gram hatte sehr Recht, hierauf bei Mittheilung seiner Methode Werth zu legen, weil dies kokkenkettenähnliche Aussehen bei derselben viel öfter und regelmässiger ausgebildet ist, als bei der gewöhnlichen Säureentfärbung. Ebenso fand er in 3 Fällen von Milzbrand mehrfach dieselben Formen, welche Koch in Tafel VII Nr. 39 Mitth. d. Kais. Gesundheitsamts Bd. I abgebildet. Koch sagt hierüber (pag. 44):

> „Die Milzbrandbacillen gehen an dieser Stelle bis dicht an die von Epidermis entblösste Oberfläche der Geschwulst. Darüber hinweg ist eine Schicht ausserordentlich zierlicher und feiner Bacillen gelagert, welche dadurch ausgezeichnet sind, dass in ziemlich regelmässigen Abständen dunkler gefärbte Punkte eingelagert sind. Am meisten nach aussen befinden sich einige Bacillen, in denen diese Punkte kaum angedeutet sind, daneben lassen sich alle Uebergänge bis zu solchen auffinden, in denen die Bacillensubstanz fast verschwunden, dagegen die dunklen Punkte sehr ausgesprochen hervortreten. Ob dies fortlaufende Stufen der Entwicklung und vielleicht Sporenbildung sind, vermag ich bislang nicht zu entscheiden. Sollte es sich um Sporen handeln, dann würden diese sich von den übrigen bekannten Bacillensporen sehr wesentlich unterscheiden, weil letztere bei der Kernfärbung keine Anilinfarbstoffe aufnehmen."

Wir können heute diese Gestalt der Milzbrandbacillen nicht nur zufällig und vereinzelt, sondern in schönster Regelmässigkeit durch das ganze Präparat erzeugen, und zwar durch eine zweckmässige Modification der Gram'schen Methode, und wissen be-

stimmt, dass die zierlichen Milzbrandbacillen Koch's aus den gewöhnlichen gröberen einfach durch eine fortschreitende Entfärbung entstanden sind. Ebenso können wir heute mit einer Regelmässigkeit, deren wir in histotechnischen Dingen nicht immer Herr sind, innerhalb der Tuberkel- und der Leprabacillen eine kokkenähnliche Structur zur Anschauung bringen. Diese kokkenähnlichen Gebilde innerhalb der stabförmigen Bacillenmembran werden durch die Gram'sche Methode in zweckmässiger Modification so sicher gefärbt, wie die meisten freien Kokkenformen, so dass es wohl gerechtfertigt ist, den Schwerpunkt dieser Methode überhaupt in der Darstellung von Kokken zu sehen.

Die Gram'sche Methode leistete zum ersten Mal den Dienst, eine Reihe von Bakterien tinctoriell vom gesammten thierischen Gewebe zu differenziren, während bis dahin alle Methoden nur die Bakterien und Kerne gemeinschaftlich zu isoliren vermochten. Daher die weite Verbreitung, welche dieselbe sofort nach ihrem Bekanntwerden erfuhr. Auch an sie schlossen sich bald eine Reihe von für die Theorie und Praxis der Tinctionslehre wichtigen Arbeiten an.

Gram selbst hatte keine theoretische Erklärung seiner Methode versucht, aber er fand die wichtigen Thatsachen, dass Fuchsin und Rubin nicht das Gentianaviolett, die einfach wässerige Lösung nicht die anilinhaltige ersetzen könne; dass weiter Jodtinctur und Jodkaliumlösung nicht die Wirkung der Jod-Jodkaliumlösung besässen, da die Bakterien dann sich gewöhnlich entfärbten; dass endlich die Präparate nach der Jodbehandlung auch gegen 3 % Salz- oder Salpetersäure enthaltenden Alkohol — ähnlich wie die Tuberkelbacillen — indifferent seien, aber nach dieser Säurebehandlung sich durch Vesuvin umfärben liessen.

Der Erste, welcher die Gram'sche Methode theoretisch beleuchtete, war Gottstein in seiner wichtigen Abhandlung: Ueber Entfärbung gefärbter Zellkerne und Mikroorganismen durch Salzlösungen (26). Gottstein brachte in derselben ein tinctorielles Princip zum klaren Ausdruck, welches durch die Entfärbungsmethoden von Gram (Jod-Jodkalium), Lustgarten (Kali hypermangan.) (48), Fütterer (Palladiumchlorid) (22), de Giacomi (Eisenchlorid) (23), besonders aber durch die Koch'sche ältere

Methode der Entfärbung vermittels einer Lösung von Kali carbonicum und daran sich anschliessenden Versuche von M. Wolff (73) über die Ausfällung von Anilinfarben durch sehr geringe Mengen kohlensauren und phosphorsauren Natrons bereits angedeutet war. Der Begriff der Entfärbung durch Salze war der in ihnen enthaltene einheitliche Gesichtspunkt, den wir Gottstein's Forschungen verdanken. Nicht bloss Metallsalze, sondern auch Salze der Alkalien und Erden und überhaupt alle von Gottstein geprüften Salze (u. A. Kali bichrom., Arg. nitr., Chlornatrium, Alaun, kohlen- und schwefelsaure Alkalien, Jodkalium) zeigen sich befähigt, in den gefärbten Präparaten den Farbstoff so zu lockern, dass eine Alkoholspülung denselben vollständig entfernen kann. Dabei steigt mit der Concentration des Salzes im Allgemeinen die Entfärbungskraft, und zwar ist dieselbe durchweg an die auch sonst eingehaltene Reihenfolge gebunden, dass Protoplasma und Intercellularsubstanzen sich zuerst, später die Kerne und einige Bakterien und erst bei der stärksten Concentration der Salze die Lepra-, Tuberkelbacillen und Pyämiekokken sich entfärben. Die für diese Entfärbungsstufen nothwendige Concentration der Salze ist dabei wieder erstens nach der Natur der Salze verschieden, sodann aber auch nach der Natur des Farbstoffes, indem beispielsweise Fuchsinpräparate schon durch schwächere Salzlösungen entfärbt wurden als Gentianaviolettpräparate.

Dieses hiermit für die Lehre von der Entfärbung gefundene neue, ungemein fruchtbare Princip ist in systematischer Weise noch viel zu wenig zur Isolirung von Bakterien und anderen Gewebstheilen ausgenützt worden. Es ist denkbar, dass sich unter der unerschöpflichen Menge von salzartigen Verbindungen schliesslich für jeden noch so leicht entfärbbaren Mikroorganismus auch ein in passendem Grade entfärbendes Salz finden lässt, wenn die Untersuchung systematisch auf diesen Punkt gelenkt wird.

So hatte Gram schon ein Jahr vorher auf dem Kopenhagener Congress — was Gottstein anscheinend entgangen ist — mitgetheilt, dass durch Behandlung mit einer 1 %igen Sublimatlösung nach der Färbung in Anilingentianaviolett sonst in Schnitten schwer

zu isolirende Bakterien (speciell Friedländer's Pneumokokken und die Typhusbacillen) gut zu differenziren sind.

Gottstein glaubte nach diesen Resultaten auch die Wirkung der Gram'schen Jod-Jodkaliumlösung auf die entfärbende Wirkung des Jodkaliums allein zurückführen zu dürfen. Doch macht er selbst sehr richtig die Bemerkung, dass die mittels Jodkalium entfärbten Bakterien nicht die tiefe Farbe besässen wie die in nach Gram hergestellten Präparaten befindlichen. Das volle Verständniss der Gram'schen Methode blieb jedoch Gottstein — s. weiter unten — noch verschlossen.

Auch darüber, wie die Entfärbung durch Salzlösungen zu Stande kommt, bildete sich Gottstein bereits eine Vorstellung. Er machte darauf aufmerksam, dass alle Anilinfarben in Salzlösungen unlöslich sind und durch sehr geringe Salzmengen aus ihren Lösungen gefällt werden. Er betrachtet nun die Entfärbung, d. i. die Trennung von Farbstoff und Gewebe, als eine Ausfällung des Farbstoffes mit Hülfe des Salzes, also ein Aussalzen desselben nach Art der Fällung von Seife durch Kochsalzzusatz. Der gefällte Farbstoff, welcher nunmehr lose auf dem Gewebe liegt, würde sodann vom Alkohol gelöst und abgespült. Hiernach müsste eigentlich der Farbstoff in den Geweben vorher in Lösung (wie die Seife im Seifenleim) und dürfte jedenfalls nicht chemisch mit dem Gewebe verbunden sein, Vorstellungen, die wohl heute — s. weiter unten — nicht mehr haltbar sind und einfacher und besser durch eine chemische Erklärung des Vorganges ersetzt werden.

Im selben Jahre (1886) erschien eine in meinem Laboratorium entstandene Arbeit von Lutz: Zur Morphologie des Mikroorganismus der Lepra (49), welche in der Folge sowohl für die Lehre von den Leprabacillen, wie für die Tinctionstechnik von hervorragender Bedeutung wurde. Eingehende botanische Vorstudien liessen Lutz erkennen, dass das bisherige Schema für die Mikroorganismen der Tuberculose, der Lepra und wahrscheinlich vieler anderen Bacillen ein durchaus unzureichendes sei. Er zeigte, dass die bis dahin nur vereinzelt gefundenen und daher für reine Kunstproducte oder Zerfallsproducte erklärten Bilder von unregelmässigen Farblücken in den Bacillen bereits Andeutungen einer

körnigen Structur derselben darstellen, welche ihm in überzeugender Regelmässigkeit und Klarheit zum ersten Male darzustellen, vermittels einer Modification der Gram'schen Methode, gelang. Auf die weittragenden Folgen dieser Entdeckung für unsere Anschauung vom feineren Bau der Bacillen überhaupt können wir hier nicht näher eingehen.

Schon Gram hatte mit Vortheil eine secundäre Entfärbung seiner Präparate mittels 3 % Säure enthaltenden Alkohols geübt, welche neuerdings auch von Günther (34) allgemein als bessere Modification der Gram'schen Methode gerühmt wird. Lutz, den Einfluss stärkerer Entfärbung auf die mit Jod und Gentianaviolett behandelten Präparate studirend, gelangte zur Anwendung immer stärkerer Säuren, bis er endlich in der 10—50 %igen rauchenden Salpetersäure ein Mittel fand, die innere Structur der so gefärbten Organismen in anschaulicher Weise aufzuschliessen, die Bacillen in regelmässige Kokkenreihen aufzulösen.

Wenn bis dahin die bakteriologischen Tinctionsmethoden fast ausschliesslich diagnostischen und differentialdiagnostischen, also praktischen Zwecken gedient hatten, so wurden sie von jetzt an auch ein wichtiges Hülfsmittel für das rein wissenschaftliche Studium der inneren Structur und der Biologie dieser kleinsten Lebewesen.

Lutz gab, auf die neuen Thatsachen fussend, eine sehr einfache und mit andern botanischen Vorkommnissen sehr gut harmonirende Darstellung von der Entwicklung der Leprabakterien. Kleine kokkenartige Rundzellen theilen sich in einer Richtung und bleiben dabei von einer Hülle umgeben, während sie sich von einander entfernen. So entstehen die schon lange bekannten Farblücken, die fälschlich für rund und daher hin und wieder auch für Sporen gehalten wurden [1]). Folgerichtig kam Lutz zur Abtrennung einer Abtheilung der Coccothrichaceen von dem Gros der Bacillen

1) So besonders von Neisser (51): „Die Sporenbildung der Leprabacillen besteht in der Formation kleiner, ungefärbt bleibender Kügelchen, welche im Bacillus den Eindruck von Lücken machen u. s. f." Nun wir wissen, dass jeder Lepra- und Tuberkelbacillus bei geeigneter Färbung diese Farblücken aufweist, ist wohl deren Deutung als Sporen, d. h. als besonderer Dauerformen, ein für alle Mal zu Grabe getragen. — Auf die Endzellen (Lutz), wahren Sporen und die Weiterentwicklung gehe ich hier nicht näher ein.

mit dem zunächst den Tuberculose- und den Leprapilz umfassenden Genus: Coccothrix. Er gab mit dieser Aufstellung den auch schon von andern Beobachtern, besonders von Schrön in dieser Richtung gemachten Befunden zum ersten Male einen unumwundenen, klaren Ausdruck.

Ich setzte die Untersuchung von Lutz fort (62) und erforschte zunächst, welche von den 4 Factoren der Lutz'schen Methode: das freie Jod, die Jodkaliumlösung, die rauchende Salpetersäure als Säure oder dieselbe als oxydirendes Mittel, als wesentlich d. h. als kokkendarstellend zu betrachten sei. Es ergab sich, dass nur das freie Jod allein die betreffenden Bilder bewirkte, während Jodkalium, Wasserstoffsuperoxyd und einfache Säuren, wie HCl, nur die bekannten, mehr oder weniger regelmässigen Bacillenbilder ergaben. Weiter erwies sich das Jod in statu nascendi hierzu am geeignetsten, und ich ersetzte deshalb mit Vortheil die Gram'sche Jod-Jodkaliumlösung durch eine extemporirte Mischung von Jodkaliumlösung (5%) und H_2O_2 oder durch dampfförmig auf den Schnitt einwirkendes Jod. Activer Sauerstoff (H_2O_2), Brom und Chlor konnten das Jod hierin nicht ersetzen.

In derselben Arbeit veröffentlichte ich eine Nachprüfung der Gottstein'schen Resultate über die Einwirkung von Salzlösungen auf gefärbte Präparate und konnte dieselben für eine grosse Reihe von Salzen bestätigen. Alle Salze stellten bei der Entfärbung den Bacillus, nicht Kokkenfäden oder Kokkenreihen dar. Neben der Salzmethode empfahl ich für den letzteren Zweck ein Entfärbungsmittel: H_2O_2 und Alkohol, wo Säuren vermieden werden sollen.

Gelegentlich eines bald darauf gehaltenen Vortrages im Hamb. Aerztl. Verein (63) konnte ich zum ersten Male Präparate vorlegen, in welchen zwei Bestandtheile dieses Organismus, nämlich die innersten kokkenförmigen Rundzellen und die sie zunächst umschliessende engere Hülle, in Contrastfarben dargestellt waren. Hierzu werden erst durch Färbung mit einem Pararosanilin-Anilinwasser die Schnitte dunkelblau gefärbt, darauf einige Secunden in eine Mischung von H_2O_2 und Jodkaliumlösung getaucht und in Alkohol entfärbt bis zum reinen Kokkenbilde; weiter in Fuchsinanilinwasser einen Moment erhitzt und mittels der Salzmethode

(Eintauchen in Kochsalz- oder Jodkaliumlösung, darauf in Alkohol) zum zweiten Male entfärbt. Die Kokken erscheinen dann dunkelblauviolett, umgeben und verbunden durch eine blassrothe feine Hülle.

Diese Bilder bewiesen nebenbei zur Evidenz, dass es sich beim Erscheinen der Kokken statt der Bacillen nicht um eine Zerstörung der letzteren, sondern nur um eine Entfärbung mit Hervortreten des gefärbt bleibenden Inhaltes handelte. Es war nämlich gegen die von Lutz und mir vorgebrachten Bilder gleich Anfangs eingewandt worden, dass dieselben einer Zerfällung oder Gerinnung des Bacillenprotoplasmas ihr Dasein verdankten. In dieser Beziehung war es auch von Wichtigkeit, dass ich die Darstellung der Lutz'schen Bilder ohne Anwendung von Säuren [1]) bewerkstelligen lehrte, obgleich ich diesem Einwand nie eine Bedeutung zumessen konnte. Denn der Werth der neuen Bilder beruhte auf ihrer absoluten Gleichmässigkeit, auf der unfehlbaren Sicherheit der Darstellung, auf ihrer Verständlichkeit und Förderung des Verständnisses des Bacillenwachsthums, nicht in der zufällig ersten Darstellungsmethode, welche übrigens nicht eingreifendere Mittel benutzte, als Koch und Gram schon benützt hatten. Denn für die praktische Differentialdiagnose hatte man starke Salpetersäure und Jodjodkalium stets gebraucht, ohne Anstoss an ihnen zu nehmen.

Nachdem das Jod allein als das Wesentliche der Lutz'schen Methode erkannt war, warfen sich naturgemäss die weiteren Fragen auf, welche Rolle dem bis dahin in allen Jodmethoden (von Gram, Lutz und mir) gebrauchten Gentianaviolett zukomme, und wie das Jodjodkalium wirke, verglichen mit dem einfachen Jod. Diesen Fragen trat ich in meiner Arbeit über Rosanilinc und Pararosaniline (64) näher. Es stellte sich durch eine Vergleichung absolut reiner Farbenproben aus der badischen Soda- und Anilinfabrik

1) Merkwürdigerweise ist mir neuerdings mehrfach nachgesagt, dass meine Bilder des Leprabacillus auf Anwendung von Säuren beruhten (so noch u. A. von Weigert), während gerade ich dieselben ohne Säuren darzustellen lehrte, nämlich Bacillen durch neutrales H_2O_2 und Alkohol, Kokken durch H_2O_2 + Ka J und Alkohol.

heraus, dass bei ganz gleicher Jodbehandlung und Alkoholentfärbung sämmtliche Pararosaniline (nicht nur das benzylirte Methylviolett: Gentianaviolett) den Organismus der Lepra in Form von Kokken, sämmtliche Rosaniline (Fuchsin, Dahlia etc.) dagegen als mehr oder minder körnige Bacillen darstellen. Diese mikrochemische Farbenreaction ist ebenso fein wie constant; die ganze Differenz zwischen Rosanilinen und Pararosanilinen besteht in dem Ersatz eines H-Atoms der letzteren durch die Gruppe CH_3 in ersteren.

Hiernach musste das Geheimniss der Jodmethoden in dem Verhältniss des Jods selbst oder irgend einer Jodverbindung speciell zu den Pararosanilinen gelegen sein. Ich veranlasste daher die Darstellung der Verbindungen des reinen salzsauren Pararosanilins wie (zur Controle) des salzsauren Rosanilins mit Jod, mit Jodkalium, mit Jodjodkalium (jodgesättigt), sowie die Herstellung der jodsauren Salze beider Farbbasen. Eine im Einzelnen an Lepraschnitten durchgeführte, histochromatische Prüfung ergab nun, dass allein die einfachen Jodverbindungen beider Farbbasen eine erhebliche Differenz zeigten. Die Jod-Rosanilinverbindung erwies sich nämlich als eine lockere, leicht zerlegbare, die Jodpararosanilinverbindung dagegen als eine relativ feste. Die Rolle des Jods und des Gentianavioletts in den drei Jodmethoden erklärt sich demnach so, dass bei den Rosanilinen nach der Jodbehandlung der entfärbende Alkohol das Jod allein aus der Verbindung des Jodrosanilins mit dem Gewebe auswäscht und die einfache Farbe im Gewebe an den Orten ihrer stärksten Bindung zurücklässt, während der Alkohol aus der Verbindung des Jodpararosanilins mit dem Gewebe nicht das Jod für sich auswaschen kann, ohne das Pararosanilin mit fortzuspülen. Der Alkohol entzieht diesen Schnitten daher das Jodpararosanilinsalz als Ganzes, wo es schwach vom Gewebe gebunden ist, und lässt es als viel dunklere Farbe zurück, wo es stark gebunden ist — in den Kokken und kokkenartigen Bestandtheilen der Bacillen. Das dunkle Blau oder Violett der Präparate nach Gram, Lutz und mir ist daher keine einfache Anilinfarbe — wie schon Gram und Gottstein und neuerdings Weigert richtig betonten — sondern

eine Jodverbindung derselben; die Art der durch alle Jodmethoden erzeugten Bakterienbilder richtet sich nicht nach der Verwandtschaft der Anilinfarbe zum Gewebe, sondern nach der speciellen Verwandtschaft ihrer Jodverbindung zu demselben.

Dieses ist die Erklärung der Wirkung meiner Art der Jodanwendung. In der Mischung von Ka J und H_2O_2 existirt keine Jodjodkaliumverbindung, solange noch Sauerstoff frei, resp. solange die Mischung noch gebraucht wird. Das Ka J und das H_2O_2 befördern nebenher die Entfärbung des Schnittes, sodass sich niemals Niederschläge von Jodfarbstoff störend geltend machen.

Etwas complicirter gestaltet sich die Jodwirkung in der Gram-schen und Lutz'schen Methode, wo eine fertige Jodjodkaliumlösung benutzt wird. Diese letztere ist weder ein gutes Entfärbungsmittel wie Ka J, noch erzeugt sie im gefärbten Gewebe die Jodverbindung des Pigments so prompt wie das Jod in statu nascendi. Sie wirkt in beiden Richtungen nur durch ihre Zersetzung in freies J und Ka J, die allerdings spurweise beständig vor sich geht und durch oxydirende Mittel sehr beschleunigt werden kann. Deshalb griff Lutz, wo er eine starke Entfärbung bewirken wollte, zur rauchenden Salpetersäure; deshalb gab er den Rath, in schwachen Farblösungen auszufärben, da sonst die Entfärbung nach dem Gebrauch der Jodjodkaliumlösung zu schwierig sei. Deshalb empfiehlt Günther (31), die letzte Entfärbung stets noch mittels Säuren vorzunehmen; deshalb hört man häufig Klagen über störende Farbstoff (= Jodfarbstoff)-Niederschläge in Präparaten, die nach der Gram'schen Methode angefertigt sind. Alle diese Schwierigkeiten umgeht man vollkommen, wenn man anstatt der fertigen Jodjodkaliumlösung, wie sie Gram vorschreibt, die Mischung von Ka J und H_2O_2 gebraucht; man kann dann ruhig vorher in den stärksten Farblösungen die Schnitte überfärben und, so viele Schnitte man wünscht [1]), in einem Schälchen färben und entfärben.

Aus dem theoretischen Theil [2]) der Arbeit wäre hier noch

1) s. Günther's Bedenken l. c.

2) Auf die Folgerungen für eine allgemeine, chemische Theorie der Färbung, die Besprechung der verschiedenen Hypothesen des Aussalzens, der Umsetzung und der Doppelsalzbildung können wir hier nur verweisen und zugleich auf die sich daran anschliessenden Artikel über Erzeugung von Farbstoffen im Gewebe (60, 61).

hervorzuheben, dass nach Abwägung aller Möglichkeiten die Theorie der Doppelsalzbildung sich als die bestgestützte unter den drei Theorieen zur Erklärung der von Gottstein eingeführten Methode der Salzentfärbung erwies. Die zur Entfärbung benutzten Salze verbinden sich in dem gefärbten Gewebe mit dem Farbsalze zu Doppelsalzen. Hierbei lockert sich der Farbstoff in dem grössten Theil des Gewebes derart, dass die folgende Alkoholdurchspülung diesen Theil farblos zurücklässt. Dort, wo der Farbstoff stärker an das Gewebe gebunden ist, bildet sich zunächst die Tripelverbindung: Gewebe + Farbsalz + Entfärbungssalz. Was aus dieser wird, ist bisher nicht untersucht und wird auch wohl in verschiedenen Fällen verschieden sein. Beim Auswaschen mit Alkohol kann nämlich entweder Gewebe und ein Farbantheil zurückbleiben, während das Entfärbungssalz, mit einem anderen Farbantheil verbunden, fortgespült wird, oder die Tripelverbindung kann sich dem Alkohol gegenüber beständig erweisen. Die Entscheidung dieser Frage auf mikrochemischem Wege ist dort leicht, wo die Tripelverbindung anders gefärbt ist wie die einfache Verbindung: Gewebe + Farbsalz (z. B. beim Entfärben mit unterchlorigsaurem Natron). Auch durch Benutzung des Goldchlorides zur Entfärbung und das Studium der späteren Reduction von Goldresten im Gewebe wird sich diese subtile Frage für manche Fälle entscheiden lassen.

Ein Rückblick auf die Gram'sche Methode und die sich an dieselbe anschliessenden Modificationen lehrt uns, dass alle nur als Variationen einer allgemeinen Pararosanilin-Jod-Alkohol-Methode zu betrachten sind. Die von mir für viele Fälle als die beste angegebene Form benutzt als Farbstoff das ungemein tief und echt färbende Victoriablau (ein methylirtes Naphtholderivat des Pararosanilins) und Jod in der extemporirten Mischung von Ka J und H_2O_2.

Das Victoriablau verträgt keinen Zusatz von Ammonium carbonicum, wird nicht verbessert durch einen solchen von Anilinwasser, wohl aber kann man es vortheilhaft in Carbolwasser lösen, sowohl wenn man mit Jod und Alkohol, als wenn man mit Säuren und Alkohol entfärben will. Es führt uns diese Wahrnehmung,

nachdem wir die Theorie der wichtigsten beiden Entfärbungsmethoden so weit, wie es zur Zeit möglich, verfolgt haben, noch einmal zurück zu dem Punkte, welcher allein eine befriedigende Erklärung nicht gefunden hat. Was ist nämlich der Nutzen des Alkalizusatzes zu den Farblösungen, wie ihn Koch zuerst empfahl? Und weiter: Besteht irgend eine Analogie mit der Wirkung des Anilins, sind Alkalien auch als Beizen zu betrachten?

Um den Sinn des Alkalizusatzes möglichst zu verstehen, gehen wir am besten von seinem Gegensatz, dem Säurezusatz, aus. Wir wissen längst, dass die basischen Anilinfarbstoffe, die wir in Form neutraler Salze anzuwenden gewohnt sind, in Säuren leicht und meist ohne Zersetzung löslich sind, dass sie grösstentheils beim Zusatz von Säuren in wässeriger Lösung ihre Farbe verändern (rothe in gelb, blaue in grün etc.) unter Bildung mehrsäuriger Salze, in alkoholischer oder gemischt alkoholisch-wässeriger Lösung jedoch die ursprüngliche Farbe trotz Säurezusatz behalten, resp. bei Zusatz von Alkohol zur wässrigen, entfärbten Lösung dieselbe wiedererlangen. Diese angesäuerten Lösungen gehören zu den farbschwachen Lösungen, welche nur zur directen isolirten Färbung solcher Gebilde tauglich sind, die besonders stark Farben anzuziehen vermögen. Umgekehrt wissen wir auch seit den ersten Anilinfärbversuchen, dass wir den Lösungen basischer Anilinfarbstoffe nur sehr geringe Mengen von Alkalien zusetzen dürfen, wenn wir nicht die Farbbasen aus den Farbsalzen ausfällen wollen, wodurch sie zum Färben ganz untauglich werden. Nun finden wir als durchgehende Regel, dass alle basischen Anilinfarben mit einem sehr geringen Zusatz von Alkalien, der noch nicht hinreicht, um sofort eine deutliche Fällung hervorzurufen, aber sich doch schon physikalisch bemerkbar macht, am allerbesten, d. h. raschesten und intensivsten färben. Dies erscheint nun im Lichte des gegentheiligen Verhaltens bei Säurezusatz einigermaassen verständlich. Eine Farbe, welche um so schwieriger sich mit dem Gewebe verbindet, je löslicher man sie in ihrem Lösungsmittel durch Säurezusatz macht, wird sich um so leichter mit dem Gewebe vereinigen,

je schlechter sie in ihrem Lösungsmittel gelöst ist, ohne dass sie bereits ausgefällt wird.

Gerade die Farben zeigen nun sehr deutlich, dass es in der That ein Uebergangsstadium aus dem der vollkommenen Lösung in das der completen Fällung giebt, welches wir als eine Vorbereitung zur Ausfällung bezeichnen müssen. Dieses Uebergangsstadium ist zur Ausfärbung ganz besonders geeignet; es wird bei einigen Farbsalzen, besonders den Rosanilinen und Pararosanilinen, stets durch einen geringen Zusatz von Alkali hervorgerufen.

Bei dem allmählichen Zusatz einer sehr schwachen, alkalischen Lösung zeigen diese Farben nicht gleich eine Fällung, sondern zunächst eine Farbenveränderung. Die Lösung wird heller, verliert den eigenthümlichen Glanz und die Tiefe der Anilinfarben, erhält, auf dunklem Hintergrunde mit der Originallösung verglichen, einen weisslichen Schimmer und verbleibt so eine Zeit lang, wenn man nun mit dem Zusatz von Alkali aufhört. In einer solchen Flotte befindet sich der Farbstoff nicht mehr vollkommen in Lösung, obgleich sie mit blossem Auge vollständig klar erscheint. Wartet man einige Zeit, so fängt das Pigment an sich feinflockig auszuscheiden, und am anderen Tage findet man am Boden der entfärbten Lösung ein Präcipitat derselben.

Um dieses Stadium der „Vorbereitung zur Ausfällung“ oder — um mich eines kurzen, aber bezeichnenden Ausdrucks zu bedienen, welcher mir von befreundeter Seite gerathen worden — dieses Stadium der „Schwebefällung“ etwas genauer kennen zu lernen, habe ich mit 8 Anilinfarbstoffen Versuche angestellt: Victoriablau B, Benzyl-Pentamethyl-Pararosanilin (sog. Gentianaviolett), mehrfach methylirtes Rosanilin, Fuchsin S, Methylenblau, Saffranin und Vesuvin. Die ersten 6 waren garantirt reine Farbenproben aus der Badischen Soda- und Anilinfabrik, die beiden letzten aus zweiter Quelle bezogen, also ohne Gewähr der Reinheit und Kenntniss der genauen Zusammensetzung.

Von allen Pigmenten wurden in Wasser und Spiritus zu gleichen Theilen einprocentige Lösungen bereitet und durch Vermischen von 1 ccm derselben mit 100 ccm Wasser Lösungen vom

Gehalte 0,1 % an Farbstoff hergestellt, welche hinreichend durchsichtig (im Reagensglase) waren, um die feinsten Trübungen bei durchfallendem Lichte zu erkennen. Der Alkalizusatz bestand in einer 1 %igen Lösung von officineller Ammoniakflüssigkeit resp. einer einprocentigen Lösung von Kali causticum.

Von den genannten Farben ertrugen nur Methylenblau und Saffranin den Zusatz von gleichen und mehr Volumina dieser Laugen, ohne eine sichtbare Veränderung zu erfahren. Hier schien der Zusatz der Alkalien ein unbegrenzter werden zu können; auch nach 24 Stunden waren die Lösungen noch gleich gut gefärbt, klar und ohne Präcipitat.

Beim Vesuvin entstand nach Zusatz von 10 Tropfen der NH_3-Lösung zu 1 ccm Farblösung eine plötzliche Umfärbung aus Orange in Hellgelb; ebenso bei 5 Tropfen der Kalilösung.

Die Fuchsinlösung zeigte beim Zusatz von 10 Tropfen NH_3-, resp. 20 Tr. KHO-Lösung (stets zu 1 ccm Farblösung) plötzlich vollständige Entfärbung [1]) ohne eine Spur von Trübung.

Die Lösung von Victoriablau erlitt ebenfalls, und zwar schon beim Zusatz des ersten Tropfens NH_3- oder KHO-Lösung, eine Entfärbung in dunkel Rothbraun: nach 24 Stunden war die so verfärbte Lösung noch unverändert, klar und ohne Bodensatz.

Nur die übrigen drei sog. Methylvioletts zeigten beim vorsichtigen Zusatz von Alkali sehr deutlich ein Stadium der Schwebefällung, ohne dass sonstige Zersetzungen oder Verfärbungen eintraten. Bei Zusatz gleicher Volumina der Laugen zeigte in allen Fällen die Mischung im Reagensglase sofort bei reflectirtem Licht eine leichte Farbenveränderung ins Matte, Duffe; die Brillanz der Färbung war verschwunden. Auf dunklem Hintergrunde zeigten sie, verglichen mit den ursprünglichen Lösungen, eine weissliche Trübung und etwas geringere Farbentiefe. Nach einigen (durchschnittlich vier) Minuten begann die feinkörnige Trübung bei durch-

1) Diese bemerkenswerthe Differenz zwischen Fuchsin und den übrigen Rosanilinen sowie andere Unterschiede, welche weiter unten angeführt sind, zeigen deutlich, dass unter den käuflichen Fuchsinen nicht einfach reine salzsaure Rosaniline cursiren.

fallendem Lichte wahrnehmbar zu werden, und nun entfärbten sich die Lösungen rasch und vollständig.

Hierbei zeigte sich gelegentlich noch eine bemerkenswerthe Abhängigkeit des Termins der Ausfällung von physikalischen Momenten. Wurden bei dem methylirten Pararosanilin die Mischungen mit Alkalien in Reagensgläsern vorgenommen und die Hälften derselben sofort in reine (besonders von jedem Fetthauch befreite) Porcellanschälchen gegossen, so traten Entfärbung und Ausfällung in diesen Schälchen jedesmal früher ein als im Reagensglase oder in einem reinen gläsernen Uhrschälchen (dort etwa in 2, hier in 7 Minuten). Diese Beobachtung betraf jedoch nur das methylirte Pararosanilin, welches sich vor den anderen Methylvioletts auch darin unterschied, dass sie das Porcellanschälchen benetzte und sofort ein feines, gefärbtes Häutchen absetzte, während sie sich vom Glase zurückzog.

Ich erwähne diese Beobachtung, weil sie mit anderen Wahrnehmungen zusammentrifft, die wohl schon viele Bakteriologen gleich mir zu machen Gelegenheit hatten. Man kann dieselben so zusammenfassen, dass man sagt: alle Farbflotten, welche rasch am Gefässe, in welchem ausgefärbt wird, ein Häutchen absetzen, färben auch die Schnitte rasch und werden rasch für später etwa hineingegebene Schnitte unbrauchbar; diejenigen Farblösungen hingegen, welche (selbst an Porcellanschälchen) nur langsam ein Farbhäutchen abgeben, färben auch die Schnitte langsam und erhalten sich ihr Farbevermögen für mehrere successive Färbeoperationen. Da nun langsamere Färbung in von Fällung freien Farbflotten im Allgemeinen bessere Auslese der Färbung ergiebt, so ist es anzurathen, solche Farbstoffe, welche leicht zur Bildung von Häutchen an den Gefässoberflächen Veranlassung geben, besonders methylirte Pararosaniline, in Glas- und nicht in Porcellanschälchen zu gebrauchen und alle Schnitte sofort nach der Mischung der Farbflotte und auf einmal in dieselbe zu bringen.

Wenn nun in der That das Phänomen der Schwebefällung bei einzelnen Farbflotten nach Mischung derselben mit Alkalien auftritt und geeignet erscheint, wenigstens dort die intensive Tinctionskraft solcher Lösungen erklären zu helfen, so ist hier der Ort,

eine andere Versuchsreihe anzuknüpfen, welche sich nicht auf die Alkalien, sondern auf Anilin und verwandte Beizen in ihrem Verhalten zu Farblösungen bezieht. Denn es ist allgemein bekannt, dass auch derartige Mischungen einestheils an der Gefässoberfläche, andererseits als irisirendes Häutchen an der Flüssigkeitsoberfläche häufig gefärbte Präcipitate absetzen unter theilweiser Entfärbung, ohne zur Färbung von Schnitten verwandt zu sein.

Ich benutzte zu dieser Versuchsreihe dieselben soeben näher charakterisirten 8 Farblösungen. Zum Vergleiche mit Anilinwasser zog ich 8 andere Beizen hinzu, nämlich, ausser fünfprocentigem Carbolwasser und Thymolwasser, gesättigtes β-Naphtholwasser, Seifenwasser, 1 %ige Lösung von Ammon. carbon. (Kühne), Aq. laurocerasi, Aq. foeniculi und Aq. menthae piperitae. Die Farbflotten wurden hergestellt durch Eintropfen eines gleich grossen Tropfens der 1 %igen halb spirituösen, halb wässrigen Farblösungen in diese Beizflüssigkeiten.

(Siehe Tabelle S. 53.)

Aus dieser Tabelle geht hervor, dass die methylirten, benzylirten und naphthylirten Rosaniline und Pararosaniline sich ziemlich gleichartig gegenüber dem Carbol-, Thymol- und Naphtholwasser verhalten, indem sofort wirkliche Trübung oder Schwebefällung, später unvollständige oder vollständige Ausfällung des Farbstoffes (in Verbindung mit der Beize) eintritt. Seifenwasser und Bittermandelwasser führen in denselben nur eine leichte Verfärbung herbei, während Fenchel- und Pfeffermünzwasser sie anscheinend unverändert lassen, mit Ausnahme des Victoriablaus, das durch Pfeffermünzwasser fast ausgefällt wird. Auch das Ammoniumsalz verändert dieselben wenig oder gar nicht, mit Ausnahme des durch Zusatz desselben zersetzten Victoriablaus.

Ganz abweichend verhält sich auch hier das zu den Rosanilinen gehörige Fuchsin S. Die kirschrothe Lösung wird durch Anilin-, Naphthol-, Thymol-, Seifen- und Pfeffermünzwasser und die Ammoniumsalzlösung ganz oder fast ganz — ohne Fällung — entfärbt; die Farbe hält sich nur — wie bekannt — in Carbolwasser, fast ganz in Bittermandelwasser und wird merkwürdigerweise noch tiefer kirschroth gefärbt durch Fenchelwasser.

	Victoriablau	Benzyl-Pararos.	Methyl-Pararos.	Methylros.	Fuchsin S.	Saffranin	Metbylenblau	Vesuvin	*)
Anilin	S. E., T. S. E., T.	bläulich T. bläulich U. F.	blau T. blau T.	bläulich T. bläulich U. F.	U. E. V. E.	0 0	grünlich — gelblich S. E.	gelb gelb	sofort nach 24 St.
Naphthol-β	U. E., Scb. V. F.	U. E., Sch. V. F.	U. E., Sch. V. F.	blau T., Sch. V. F.	U. E. V. E.	0 0	heller heller	gelbgrün gelbgrün	sofort nach 24 St.
Tbymol	U. E., Sch. U. F.	U. E., Scb. U. F.	blau Sch. U. F.	blau — U. V.	V. E. V. E.	0 S. F.	heller heller	gelbgrün T. gelbgrün T.	sofort nacb 24 St.
Pbenol	Sch. V. F.	blau Scb. V. F.	blau Sch. V. F.	bläulich Sch. bläulich U. F.	0 0	0 0	beller heller	0 0	sofort nach 24 St.
Seifenwasser	beller heller	bläulich	bläulich	bläulich	V. E. V. E.	T., deutlich dichroitiscb	grünlich	gelbgrün orange, T.	sofort nach 24 St.
Aq. mentb.	Scb. U. F.	0 0	0 0	0 0	U. E. U. E.	0 gelblich	etwas heller	0 0	sofort nach 24 St.
Aq. foenic.	0 0	0 0	0 0	0 0	tief kirscbroth	0 gelblich	beller heller	0 0	sofort nach 24 St.
Aq. amygd.	etwas beller	bläulicb blau	bläulich	bläulich	0 S. E.	0 0	heller heller	0 T.	sofort nach 24 St.
$(NH_4)_2$-CO_3	zersetzt	0 0	0 0	bläulich	V. E. V. E.	gelblich	0 0	gelbgrün	sofort nach 24 St.

*) In dieser Tabelle bedeutet die einfache Angabe einer Farbe die so nüancirte Verfärbung der ursprünglichen Farbe; T. = Trübung; Null (= 0) = Abwesenheit jeder Veränderung; Scb. = Schwebefällung; S. F. = Schwache Fällung; U. F. = Unvollständige Fällung; V. F. = Vollständige Fällnng; S. E. = Schwache Entfärbung; U. E. = Unvollständige Entfärbung; V. E. = Vollständige Entfärbung.

Die Saffraninlösung wird durch die meisten der 9 Zusatzflüssigkeiten gar nicht verändert. Fenchel-, Pfeffermünzwasser und Ammoniumsalzlösung bringen eine gelbliche Verfärbung hervor. Nur gegen Seifenwasser zeigt Saffranin ein eigenthümliches Verhalten, indem die Mischung sofort und dauernd trübe und deutlich dichroitisch wird (roth-gelb), ohne dass nach 24 St. ein Niederschlag entstände.

Aehnliche Indifferenz wie Saffranin zeigt Methylenblau gegen dieselben ätherisch-öligen und phenolartigen Zusätze; die Mischungen werden sämmtlich nur blasser, die mit Anilin- und Seifenwasser zugleich grünlich verfärbt; absolut keine Veränderung bringt die Mischung mit Ammoniumsalzlösung hervor.

Die Vesuvinlösung bleibt unverändert mit Phenol-, Pfeffermünz- und Fenchelwasser und bis auf eine Trübung mit Bittermandelwasser. Mit Anilinwasser verfärbt sie sich gelb, mit Naphthol-, Thymolwasser, Ammoniumsalzlösung und Seifenwasser gelbgrünlich; bei letzterem schlägt die Farbe unter flockiger Trübung (Ausscheidung von Fettsäure) wieder in die frühere Orangefärbung um.

Manche der in dieser kleinen Tabelle angeführten Reactionen geben zu praktischen Versuchen Anlass. So die Reaction zwischen Victoriablau und Pfeffermünzwasser, zwischen Saffranin und Seifenwasser, Fuchsin und Fenchelwasser, den methylirten Rosanilinen und Pararosanilinen und Naphtholwasser. Für die uns hier beschäftigende Frage jedoch, ob der Zusatz des Anilins, Phenols und ähnlicher Stoffe eine Ausfällung zur Folge hat, analog derjenigen, welche durch Alkalizusatz bewirkt wird, giebt sie im Allgemeinen eine verneinende Antwort.

Zwar zeigt die gebräuchliche Mischung von Anilin- oder Carbolwasser mit Gentianaviolett (Benzyl-Methyl-Pararosanilin) eine Schwebefällung und später völlige Ausfällung des Farbstoffs, aber Fuchsin bringt in Anilin-, resp. Carbolwasser keinen Niederschlag hervor, und Gentianaviolett und Methylenblau bleiben mit der Ammoniumsalzlösung (Kühne) ganz klar. Das physikalische Moment der Vorbereitung zum Ausfall (Schwebefällung) kann also bei den soeben betrachteten Beizen nicht

für die Echtheit und Brillanz der Färbung den Ausschlag geben.

Wir kommen also auch hier per exclusionem zu dem Schlusse, dass die Rolle der phenol- und ölartigen Beizen, wie Ehrlich zuerst constatirt hat, auf ihrer Verbindungsfähigkeit mit dem Farbstoff beruht; die Schwebefällung, welche durch einzelne derselben nebenher erzeugt wird, macht in keinem Falle allein das Wesen derselben aus. Sie stellt also wohl auch sonst nur ein Moment dar, welches im Allgemeinen den Act der Färbung erleichtert und beschleunigt, nicht mehr.

Der Sinn des Alkalizusatzes dagegen mag sich in einigen Fällen mit dem der Schwebefällung decken. Echte Beizen sind die Alkalien nicht, da es keine mehrbasischen Farbstoffe giebt, welche aus Farbsalz und Alkali zusammengesetzt sind. Allerdings ist der volle Sinn des Zusatzes von Alkalien hiermit keineswegs erschöpft. Betrachten wir nämlich die Methoden, welche Zusätze von Alkalien zu den Farbflotten vorschreiben, so müssen wir drei verschiedene Typen unterscheiden: die Löffler'sche Kali-Methylenblaulösung, die Weigert'sche Ammoniak-Gentianalösung und die Kühne'sche Lösung von kohlensaurem Ammoniak (1%) als Zusatz zu Methylenblau oder Pararosanilinsalzen. Diese Mischungen sind unter sich gewiss nicht gleichwerthig.

Nur die Weigert'sche Lösung (68) stellt eine in Schwebefällung befindliche und aus diesem Grunde zur raschen Färbung geneigte Flotte dar. Die Löffler'sche Mischung (30 ccm einer conc. alkohol. Methylenblaulösung zu 100 ccm einer 0,1%igen Kalilauge) enthält den Farbstoff in vollkommner Lösung und der Zusatz des Alkalis kann daher hier nur eine Beziehung auf das zu färbende Gewebe selbst oder auf dessen Verbindung mit dem Farbstoff besitzen, die noch für sich zu erforschen ist. Die alkalisch reagirende Salzlösung endlich, welche Kühne (44) benutzt, bildet mit dem Farbsalz vor der Färbung bereits ein Doppelsalz, analog den von mir benutzten Jodkaliumverbindungen der Rosanilin- und Pararosanilinsalze. Erst wenn jener Nutzen des Alkalizusatzes zur Löffler'schen Methylenblaulösung erklärt sein wird, ist es möglich, zu eruiren, ob der Zusatz des alkalischen Salzes auch noch

auf die Weise wirkt. Für jetzt müssen wir einfach annehmen, dass in der Kühne'schen Farbflotte die Doppelsalzverbindung von Ammonium- und Farbsalz gelöst (nicht in Schwebefällung, s. Tabelle) vorhanden ist und als Ganzes die Verbindung mit dem Gewebe eingeht.

Nur diese letztere Art des Alkalizusatzes (als basisch reagirendes Salz) ist mithin vergleichbar dem Zusatz von Anilinwasser und Phenolwasser; beide stellen wirkliche Beizen vor, Bindemittel zwischen Gewebe und Farbsalz.

Den reinen Alkalizusatz, sei es nun, dass er in einem Falle eine Schwebefällung bewirkt oder in anderem Falle auf noch unbekannte Weise die Färbung erleichtert (bessere Benetzung?), kann ich bei basischen Farbstoffen nicht als Beize gelten lassen, so wenig als wie es bei diesen Pigmenten eine Entfärbungmethode durch Alkalien giebt. Es sind Erleichterungsmittel der Färbung, aber nicht Bindemittel zwischen Farbe und Gewebe.

Als echte Beizen bleiben uns demnach: das Anilin, Toluidin, Phenol, Thymol, Naphthol [1]) und Salze, wie das Ammonium carbonicum. Die Zahl derselben wird sich wohl noch und mit Vortheil für bestimmte Zwecke leicht vermehren lassen (ätherische Oele, Seife, Sulfoleate u. s. f.).

Weigert (68) und Koch (41) (in seiner ersten Methode der Tuberkelbacillenfärbung) hatten bereits die Umfärbung gefärbter Präparate zur optischen Isolirung der Bakterien benutzt (s. oben). Ehrlich (15) hatte dasselbe Princip angewendet, um theoretisch die stärkere Verwandtschaft verschiedener Farbstoffe zu einem Mikrobion, ihre tinctorielle Kraft — speciell gegenüber dem Tuberkelbacillus — zu untersuchen. Löffler verwandte zuerst einen sauren Farbstoff (Tropäolin) in Verbindung mit Säuren zur Differenzirung. Kükenthal (45) hatte viele Anilinfarben und sogar Carmin in Terpentinöl und Nelkenöl, Eisler (16) in Bergamottöl (1:200—1000) aufgelöst (speciell Eosin, Methyleosin und Diamantfuchsin) und direct mit diesen öligen Farblösungen diffuse Färbungen und Contrastfärbungen hervorgerufen.

---

1) Nach eigener Erfahrung.

Aus diesen und ähnlichen gelegentlichen Versuchen entwickelte Kühne (43) eine sehr allgemein brauchbare Entfärbungsmethode. Er benutzt zur Umfärbung saure Farbstoffe, vor Allem Fluorescin und Eosin, indem er durch letzteres (auch durch Auramin, Alkaliblau, Lichtgrün) zugleich mit der Entfärbung eine dauernde Contrastfärbung verbindet. Der Fluorescinalkohol dient ihm jedoch bei Fuchsin- und Methylviolettpräparaten nur zur Entfärbung und theilweisen Entwässerung, indem er das Fluorescin wieder durch Alkohol entfernt. Da in methylenblau gefärbten Präparaten der Fluorescinalkohol das Blau auch aus den Bakterien zu leicht auszieht, werden diese erst durch mit Methylenblau versetzten Alkohol schonend entwässert (s. unten) und dann durch Eosinnelkenöl differenzirt, resp. umgefärbt [1]).

Auch bei der Gram'schen Methode ersetzt mit Vortheil die Entfärbung durch Fluorescinalkohol (dann reinen Alkohol, Nelkenöl) die einfache Alkohol-, resp. Alkohol- und Säureentfärbung (Lutz (49), Günther (33)). Kühne rühmt dieser Modification die Schonlichkeit (grössere Anzahl gefärbt bleibender Bakterien), Schnelligkeit der Entfärbung und die sichere Vermeidung von Farbstoffniederschlägen nach. Alle bisherigen Modificationen der Gram-schen Methode suchen — wie wir bereits oben sahen — besonders die letzteren zu vermeiden.

Nachdem wir die Säure-, die Jod-, die Salzentfärbungen und die Umfärbung durch saure Farbstoffe besprochen haben, können wir uns erst zu derjenigen Entfärbungsmethode wenden, welche, theoretisch genommen, als die complicirteste erscheint, ich meine das Verfahren von Lustgarten zur Darstellung seines Syphilisbacillus (48).

Lustgarten verfolgte die Idee, die gefärbten Schnitte nach Art der in der Technik üblichen Methoden mittels oxydirender Mittel zu bleichen. Er versuchte zuerst Wasserstoffsuperoxyd, jedoch ohne Erfolg. Da ich selbst (62) diese Flüssigkeit zum Zwecke der Entfärbung empfohlen habe, so muss ich gleich auf diesen

---

1) Neuerdings braucht Kühne 1—2‰ Salzsäure zur Differenzirung von Ammoniak-Methylenblau-Präparaten (44).

Punkt näher eingehen. In der (etwa 3 % H_2O_2 enthaltenden) Lösung von Wasserstoffsuperoxyd selbst entfärben sich allerdings die mit basischen Anilinfarben gefärbten Schnitte nicht, aber die Farbe wird doch so gelockert, dass sie darauf durch Alkohol leicht fortgeschwemmt werden kann. Der active Sauerstoff des Wasserstoffsuperoxyds hat auf die Farblösungen keinen bemerkenswerthen Einfluss. Die Wirkung auf die gefärbten Schnitte kann daher, wie ich das immer angenommen habe, nur auf das Gewebe selbst gehen. Bekanntlich bewirkt es ausser der Aufhellung der Gewebe (durch Reoxydation verschiedener mittels Reduction entstandener Pigmente) eine Quellung fast aller Bestandtheile, besonders des Protoplasmas und Collagens. Alle Gewebe sind aber in gequollenem, stark wasserhaltigem Zustande weniger färbbar als in natürlichem oder geschrumpftem. Das Pigment wird daher immer aus seiner Verbindung mit dem Gewebe durch H_2O_2 auf physikalischem Wege gelockert. Hiermit ist aber nicht gesagt, dass nicht andere, leichter oxydirbare Farben unter Umständen auch auf dem Gewebe oxydirt und dabei auch eventuell aus der Verbindung mit dem Gewebe befreit werden könnten.

Nach dem H_2O_2 versuchte Lustgarten das unterchlorigsaure Natron, und zwar mit besserem Erfolge. Er konnte damit besonders gut Leprabacillen darstellen und erzeugte sogar Doppelfärbungen, indem dabei allein die Farbe des thierischen Gewebes sich in Grün (bei Gentianaviolett) oder Braun (bei Fuchsin) verwandelte [1]). Lustgarten ist aber auch hier nicht geneigt, die Entfärbung dem in Activität gesetzten O, sondern dem Cl zuzuschreiben, welches vielleicht eine ähnliche Rolle spiele, wie das Jod in dem Gram'schen Verfahren. Hierin muss ich Lustgarten nach meinen Versuchen mit den verschiedensten Arten der Chlor- und Bromanwendung unbedingt Recht geben. Aber wenn auch nicht der O — der doch nur indirect in Frage käme — hier

1) Lustgarten gebührt die Priorität in der Auffindung dieser auffallenden Verfärbung durch unterchlorigsaures Natron; ich wurde ebenfalls selbständig auf dieselbe aufmerksam, übersah jedoch bei Mittheilung derselben (64) die frühere Mittheilung Lustgarten's.

neben dem Cl eine Rolle spielt, so kommt doch noch das unterchlorigsaure Natron als Salz in Betracht. Es liegt hier für die Chemiker die Entscheidung der Frage vor, ob das Fällungsproduct der basischen Anilinfarben mit unterchlorigsaurem Natron dieses letzte Salz ganz oder nur ein Chloratom einschliesst; mir ist es aber nach der ganz verschiedenen (mikrochemischen) Farbenreaction der Gewebe bei Einwirkung von unterchlorigsaurem Natron einerseits, Cl andrerseits nicht zweifelhaft, dass das Salz als solches eine Doppelsalzverbindung mit dem Farbsalze eingeht.

Trotz dieser nicht ermuthigenden Resultate, die gefärbten Gewebe durch Oxydation zu entfärben, verfolgte Lustgarten denselben Gedankengang weiter und gelangte so zu seiner definitiven Entfärbungsmethode. Dieselbe beruht bekanntlich darauf, dass durch Eintauchen in übermangansaures Kali ($1\frac{1}{2}\,\%$) im gefärbten Schnitt ein Niederschlag von Mangansuperoxyd erzeugt und dieser sodann durch schweflige Säure aufgelöst wird, wobei die Farbe in den Syphilis-(Lepra-, Tuberkel-)bacillen erhalten bleibt, während sie aus dem thierischen Gewebe ausgezogen wird. Lustgarten rechnet offenbar in dieser Methode noch mit einer Oxydation als wesentlichem Factor, denn er sagt: „Zum Entfärben der intensiv gefärbten Schnitte verwende ich die oxydirende Eigenschaft des übermangansauren Kalis in Verbindung mit schwefeliger Säure.“ Der Fall liegt hier aber noch complicirter als beim unterchlorigsauren Natron.

Das übermangansaure Kali giebt in der Lustgarten'schen Methode zweimal einen Antheil seines Sauerstoffs her, wobei Oxydationen stattfinden können. Zunächst verwandelt sich beim Zerfall des Salzes die Uebermangansäure in Mangansuperoxyd. Der hierbei freiwerdende O kann eine Quellung des Gewebes mit Lockerung des Farbstoffs auf physikalischem Wege wie beim H_2O_2 bewirken. Ausserdem wird bei Zersetzung des Salzes Kali frei, was sich an der veränderten Reaction der Lösung erkennen lässt. Das freie Alkali, welches vor der Färbung oder als Zusatz zur Farbflotte zur Fixirung der Farbe beiträgt, wird bei der Ent-

färbung ebenfalls durch Quellung des Gewebes den Farbstoff lockern und so zur Entfärbung mithelfen [1]).

Die zweite Abgabe von Sauerstoff (Verwandlung von Mangansuperoxyd in Manganoxydul) kann für die Entfärbung nicht in Betracht kommen, da sie nur in dem Maasse, als dadurch H_2SO_3 zu H_2SO_4 oxydirt wird, stattfindet.

Drittens ist ausser dem gefällten Mangansuperoxyd in der Lösung noch eine Menge unzersetzten Salzes vorhanden. Dieses unzersetzte Salz kann ebenfalls mit dem Farbstoff eine Verbindung eingehen und denselben dem Gewebe entreissen. Es wäre das eine Entfärbung nach dem Principe Gottstein's. Ob diese Art der Entfärbung statthat, liesse sich an grösseren Mengen gefärbten thierischen Gewebes wohl untersuchen, welche nach Behandlung mit Kali hypermanganicum und einfacher Abspülung des anhaftenden Salzes durch Wasser auf im Gewebe selbst gebundenes Kali hypermanganicum untersucht würden.

Viertens kommt die schweflige Säure bei dem Lustgarten-schen Verfahren in Betracht, und zwar könnte es von vornherein zweifelhaft sein, ob als Säure oder als reducirendes, Leukoverbindungen erzeugendes Mittel. Bekanntlich lassen sich die meisten Farbstoffe und speciell die basischen Anilinfarbsalze durch Sauerstoffentziehung in die ungefärbten Leukoverbindungen leicht verwandeln, augenblicklich durch Kochen mit Zinkstaub und Salzsäure, langsamer durch andere reducirende Substanzen. Speciell habe ich diesen Einfluss, der sich in sehr störender Weise bei der Conservirung gefärbter Bacillenpräparate geltend macht, für Nelkenöl (61) und verharzende Oele überhaupt nachgewiesen. Ein in Nelkenöl entfärbter, fuchsingefärbter Baumwollenfaden färbt sich an der Luft wieder roth. Die durch verharzende Oele herbeigeführte Entfärbung beruht also bestimmt nicht auf Entziehung der Farbe, sondern auf deren Verwandlung in ihr Leukoproduct. Diese Art der Entfärbung ist bereits hin und wieder zur Isolirung von Bakterien angewandt, u. A. von Lutz (49), indem er bei seiner

---

1) Derselbe Nebenumstand ist bei meiner Methode der Jodanwendung in Betracht zu ziehen $(KaJ)_2 + (H_2O_2)_3 = J_2 + O_2 + (H_2O)_2 + (KaHO)_2$.

Jodmethode den letzten Theil der Entfärbung in Nelkenöl vornahm [1]).

Sodann hat Peters (53) vorgeschlagen, die Tuberkelbacillen durch Entfärbung mittels unterschwefliger Säure (H_2SO_2) zu isoliren, nämlich in einer Mischung von saurem unterschwefligsaurem Natron ($HNaSO_2$) und Essigsäure. Peters glaubt, dass die unterschweflige Säure durch Reduction die Entfärbung bewirkt, ohne einen Beweis dafür beizubringen. Ich habe aus der dort angegebenen Quelle [2]) zur Zeit kein $HNaSO_2$ erhalten können. Soweit jedoch meine Erfahrungen mit der schwefligen Säure (H_2SO_3) reichen, reducirt dieselbe die basischen Farbsalze nicht, sondern bildet mit denselben saure Salze. Denn die durch H_2SO_3 entfärbten Farbflotten nehmen bei vorsichtigem Zusatz sehr verdünnter Kalilauge wieder den ursprünglichen Farbton des neutralen Salzes an, aber nicht beim Zusatz oxydirender Mittel (H_2O_2). Besonders gut lässt sich diese Umfärbung (abwechselnd roth und blau) hervorbringen durch Zusatz von schwefliger Säure, abwechselnd mit Kalilauge, zum Toluylenblau. Ob die unterschweflige Säure (H_2SO_2) reducirend wirkt, erscheint danach auch zweifelhaft, wäre aber einer eigenen Untersuchung werth.

Hiernach wirkt also in der Lustgarten'schen Methode keinesfalls die H_2SO_3 reducirend auf den Farbstoff oder das gefärbte Gewebe, sondern nur auf das Manganoxyd, indem sie dasselbe zu schwefelsaurem Manganoxydul neutralisirt. Auf den Farbstoff kann sie nur durch Bildung des sauren Farbsalzes wirken, wie sonst die Salpetersäure, Essigsäure u. s. f.

Diese 5 verschiedenen Factoren der Lustgarten'schen Entfärbung können natürlich nicht alle gleichzeitig bestehen. Die Einwirkung der schwefligen Säure neutralisirt ja den Einfluss des frei werdenden Sauerstoffs und Alkalis auf das Gewebe sofort. Es lösen sich also bei dieser Methode die die Entfärbung begünstigenden Umstände ab, und zwar in regelmässigem Wechsel, wenn man — wie Lustgarten empfiehlt — die beiden Entfärbungsflüssigkeiten mehrfach mit einander abwechseln lässt.

1) S. auch Kühne (43).

2) Kreuzapotheke, Bairische Strasse, Leipzig.

Im ersten Tempo tritt die Lockerung durch frei werdenden O, frei werdendes Alkali und überschüssiges Salz ein, im zweiten Tempo werden erstere neutralisirt, Mangansuperoxyd und Farbstoff durch H_2SO_3 gelöst und die Doppelsalzverbindung fortgespült. Das letztere Moment kann durch Einschieben einer sehr kurzen Alkoholbehandlung zwischen Kali hypermanganicum und H_2SO_3 (analog der Salzentfärbungsmethode) natürlich noch beschleunigt werden. Welcher von diesen Factoren hauptsächlich die Isolirung der Syphilisbacillen bewirkt und in welche Kategorie daher die Lustgarten'sche Methode eigentlich einzureihen ist, kann nur eine eingehende Untersuchung in dem angedeuteten Sinne lehren, und das Resultat wird dann auch wiederum gewiss zu Verbesserungen der Methodik in der Suche nach dem Syphiliscontagium führen.

Bekanntlich hat sich an Lustgarten's Entdeckung eine ganze Literatur über gewisse Arten von Bacillen angeschlossen, welche den Lustgarten'schen in ihren Färbereactionen ähnlich sind: die sog. Smegma- und Fettbacillen. Nachdem Alvarez und Tavel (1) dieselben im Smegma gefunden, drehte sich der Streit zunächst um ihre Identität oder Nichtidentität mit den Lustgarten'schen Bacillen (Doutrelepont (8), Matterstock (50), Klemperer (37), Weigert (70), Bienstock (5) und, als dieser zu Gunsten der Annahme specifischer Unterschiede, besonders durch Klemperer, entschieden war, um die Frage, welchen Einfluss der fetthaltige Nährboden auf die tinctoriellen Eigenschaften, besonders die Säurefestigkeit der Smegmabacillen ausübe, und im Anschluss daran um die Differenzen zwischen Smegma- und Tuberkelbacillen (Matterstock (50), Gottstein (27, 28), Bienstock (5), Bitter (6), Friedländer (20), Grigorjew (32), Spina (58), Unna (64). Die erste Reihe von Arbeiten ergab für die Theorie der Tinctionstechnik nicht viel Neues. Doutrelepont-Schütz's (8) Methode tritt aus dem Rahmen der übrigen Säuremethoden nicht heraus; Matterstock ersetzte in der Lustgarten'schen Methode Anilingentianaviolett durch Carbolfuchsin und Tavel und Alvarez die schweflige Säure durch die als Säure und als reducirendes Mittel gleichwerthige Oxalsäure.

Wichtiger für die uns hier beschäftigende Darstellung ist die zweite Reihe dieser Arbeiten, welche zum ersten Male von der künstlichen Erzeugung tinctorieller Eigenschaften der Bakterien handeln, die gewissen Arten derselben natürlicher Weise zukommen. Als etwas Anderes als den Effect einer künstlichen Einfettung der Bacillen können wir die Säurefestigkeit von Bienstock's auf Butter-Agar gezüchteten und von Spina's faulenden Fettaufgüssen entnommenen Bakterien nicht ansehen. Schon der Umstand, dass nur die gerade in den Butterinseln befindlichen Bakterien Bienstock's die Reaction gaben (obgleich ja auch der übrige Agar Butter einschloss), musste sofort die viel näher liegende Erklärung wahrscheinlich machen, dass das mit auf die Deckgläser gestrichene und bei der Eintrocknung, resp. Erhitzung von den trockenen Bakterien eingesogene, freie Fett die Ursache ihrer nachträglichen Säurefestigkeit sei. Geradezu unbegreiflich ist es, wie Bienstock, welcher den Fettgehalt seiner Bacillen auf fetthaltigem Nährboden als eine physiologische Eigenschaft derselben aufgefasst haben will, diesen Fettgehalt als einen „Fettmantel" definiren kann, welcher die Färbung erschwere und dann die Bacillen vor Entfärbung in wässerigen Flüssigkeiten schütze. Was hat denn das Fett mit der physiologischen Entwicklung der Bacillen zu thun, wenn es nur von aussen einen Mantel um dieselben bildet? Entweder die Bacillen nähren sich von Fett und speichern es unzersetzt in sich auf; dann ist der ganze Bacillus als fetthaltig anzusehen. Oder das Fett der Umgebung klebt nur mechanisch den Bacillen an, dann haben wir noch durchaus kein Recht, von einem Fettmantel zu sprechen, sondern es ist viel wahrscheinlicher, dass das anklebende Fett bei der Erhitzung, resp. Antrocknung in die Bacillen einzieht und ihnen seine Säurefestigkeit mittheilt. Spina glaubt auch in der That, dass seine Fettbacillen lebend Fett in sich aufgenommen haben, ist aber den Beweis dafür schuldig geblieben. Denn jeder faulende Fettaufguss enthält Fettsäuren und durch diese Fett in feinster Emulsion. Hätte Spina einen Fettgehalt der Bacillen wirklich beweisen wollen, so hätte er diese von dem fetthaltigen Aufguss trennen müssen, anstatt die gesammte bakterien- und fetthaltige Flüssigkeit einfach anzutrocknen und zu färben.

Matterstock (8) und Gottstein (28) drücken sich vorsichtiger aus, aber auch Gottstein kann sich nicht ganz von dem Gedanken einer physiologischen Fetthülle losmachen, obgleich in seinen eigenen Versuchen auch nichts enthalten ist, was sich nicht vollständig aus der Mischung mit Fett und nachträglicher Einfettung der todten Bacillen erklären liesse. Grigorjew (32) war es erst vorbehalten, diesen einfachen Sachverhalt, welcher einem unbefangenen Leser aus allen Versuchen, „Fettbacillen" zu züchten, von vornherein wahrscheinlich erscheinen musste, durch eingehende Experimente darzuthun. Uebrigens haben auch nur Bienstock und Spina diese „künstliche Säurefestigkeit" mit der der Tuberkel- und Syphilisbacillen identificirt, Matterstock, Klemperer, Gottstein, Friedländer, Bitter und natürlich auch Grigorjew trennen dieselbe nach Gebühr.

Spina (58) verdanken wir auch noch die Mittheilung der Thatsache, dass sich durch vorgängige Behandlung mit Gerbsäurelösungen angetrocknete Fäulnissbakterien säurefest machen lassen. Die mit Tannin gebeizten, mit Methylviolett gefärbten Bakterien verhielten sich den Tuberkelbacillen auch darin noch analog, dass sie der Umfärbung mittels Vesuvin besser widerstanden als ungebeizte, ebenso gefärbte Fäulnissbakterien. Ebensowenig können wir aber auch hier wie bei den Fettbacillen Spina's Annahme gutheissen, dass die lebendigen Bakterien die Beize in sich aufgenommen hätten. Niemand wird Spina allerdings bestreiten, dass seine Bakterien in der tanninhaltigen Nährlösung gelebt und sich vermehrt haben, denn Tannin ist, wie alle Glukoside, ein ganz guter Nährboden für manche Pilze. Aber auch hier hätten wir zum Zwecke des Beweises einer Aufnahme des Tannins seitens der lebenden Spaltpilze gewünscht, dass Spina die Bakterien vor der Färbung von der tanninhaltigen Flüssigkeit denn doch getrennt hätte. Ohne diese Maassregel fehlt jeder Grund zu seiner Annahme; es hätte ihn auch dort schon stutzig machen sollen, dass seine Resultate sofort ausblieben, wenn das Tannin in der Flüssigkeit bereits zersetzt war, denn dann hätte man doch eigentlich in

tanninfreier Flüssigkeit noch tanninhaltige Bakterien nach seiner Hypothese annehmen müssen [1]).

Diese künstliche Erzeugung einer Säurefestigkeit der Bakterien hat ein bedeutendes theoretisches Interesse. Sie ist eine von denjenigen Methoden, welche durch vorangehende künstliche Beeinflussung entweder der Bakterien oder ihrer Umgebung die nachfolgende tinctorielle Isolirung der ersteren erstreben oder wenigstens zu erleichtern suchen. Wir wollen kurz die wichtigsten der zu dieser Kategorie gehörigen Versuche hier anschliessen.

Schon die einfache Präcipitirung der gelösten Eiweissstoffe durch Erhitzen des Präparats nach Koch gehört hierher, da durch dieselbe dem Präparate färbbare, störende Theile entzogen werden. Systematisch ist dann später von Buchner (7) und Hueppe (36) die vorgängige Erhitzung angewandt worden, um die sonst unfärbbaren Sporen für Farbstoffe durchdringlich zu machen und zugleich den dazu gehörigen Bakterien die Tingibilität zu nehmen.

Wie in der prätinctoriellen Aera der Histologie Säuren und Alkalien zur optischen Isolirung bestimmter Gewebsbestandtheile, u. A. auch der Bakterien (v. Recklinghausen), angewandt wurden, so haben sie später häufig dazu dienen müssen, die nachträgliche Farbenauslese im Gewebe zu erleichtern. So war es Günther (33) durch Abspülung angetrockneter Blutpräparate mittels 5%iger Essigsäure möglich, das Hämoglobin auszuziehen und die darin enthaltenen Recurrensspirillen leichter, als es bis dahin möglich,

---

1) Spina möge mir verzeihen, wenn ich hier noch einige andere Irrthümer mir zu berichtigen erlaube, weil man bei der weitverbreiteten Unbekanntschaft heutiger Histologen mit den elementaren Eigenschaften der Anilinfarben ähnlichen Aussprüchen häufiger begegnet. Spina beschreibt den Farbenwechsel, welchen Methylviolett durch Zusatz von Salpetersäure in wässeriger Lösung erleidet (in Blau, Grün und schliesslich Gelb) und fährt fort: „Der beschriebene Farbenwechsel beruht wahrscheinlich darauf, dass die Salpetersäure den Farbstoff oxydirt und ihn successive in eine farblose Verbindung — in ein Leukanilin — überführt.“ Diese Vorstellung ist ganz unrichtig. Durch irgend welche Oxydation entsteht dieser Farbenwechsel nie, sondern durch Umwandlung der einsäurigen in mehrsäurige Farbsalze, welche — übrigens nur in wässeriger, nicht in alkoholischer Lösung — anders gefärbt sind. Der Zusatz von etwas Ammoniak oder Kalilauge zu seinen entfärbten Lösungen wird Spina eines Besseren belehren, da hierbei die alte Farbe sofort wiederkehrt. Leukaniline entstehen auch nicht durch Oxydation, sondern durch Reduction der Farbbasen und Farbsalze.

mit basischen Anilinfarben zu färben. Friedländer (21) empfahl die vorgängige Behandlung der Präparate mit 1% iger Essigsäure, um bei nachträglicher Färbung mit Anilin-Gentianaviolett die Färbung der Kapselkokken und speciell der Kapseln schärfer hervortreten zu lassen. Und in demselben Sinne empfiehlt Kühne (44) im Allgemeinen die Vorbehandlung bakterienhaltiger Schnitte mittels Oxalsäure, speciell für Typhusbacillenpräparate.

Theilweise nur gehört hierher die Einwirkung von 1% iger, wässriger oder alkoholischer Kalilauge vor der Färbung auf Tuberkelbacillen, die von Lustgarten (48) angegeben ist, da ausser ungleichmässiger Quellung der Gewebe, welche später die Selection erleichtert, wohl jedenfalls auch die besprochene Eigenschaft des Alkalis, die Tinction mit basischen Farbstoffen zu fördern, hinzukommt. Eine ähnliche, günstige Erfahrung machte Günther (33), wenn er seine mit Essig behandelten Präparate vor der Färbung dem Ammoniakdampfe aussetzte.

Um die Bakterien noch energischer aus ihrer Umgebung zu isoliren, wurden Verflüssigungen des Gewebes vorgenommen. Ich isolirte Tuberkelbacillen des Lupusgewebes durch Verdauung des letzteren mittels Pepsin-Salzsäure[1]), Biedert (4) durch Verflüssigung des Sputums, indem er dasselbe mit verdünnter Natronlauge kochte.

Gewiss sind in der Erhitzung, der Behandlung mit Säuren und Alkalien, der Verdauung, der Einfettung noch lange nicht alle Methoden präparatorischer Differenzirung erschöpft. Vielleicht sind uns noch wichtige physikalische und chemische Hülfsmittel dieser Art heute ganz unbekannt. Es mag deshalb die Erinnerung am Platze sein, dass auch schon die Art der gewöhnlichen Härtung der Gewebe zu diesen Hülfsmitteln gehört, wie die Bedeutung der Chromsäure beim Hermann'schen Verfahren, der Flemming'schen Lösung für die Mitosendarstellung lehrt. Der Alkohol gilt zur Zeit noch als das beste Erhärtungsmittel für bakteriologische Zwecke; es ist aber nicht unmöglich, dass uns

1) Discussion über Lupus. (Verhandlungen des internat. medicin. Congresses Kopenhagen 1884.)

gewisse Parasiten bis jetzt entgehen (besonders amöbenartige), weil wir fast nur absoluten Alkohol zur Fixirung aller des Parasitismus verdächtigen Gewebe anzuwenden gewohnt sind.

Ebensowenig wie wir die Vorbehandlung der Bakterien und ihrer Umgebung in Beziehung auf den Endeffect der Färbung hier vernachlässigen können, dürfen wir diejenigen Methoden übergehen, welche durch Nachbehandlung nach der eigentlichen Färbung die gefärbten Bakterien optisch besser zu isoliren gestatten. Das gewöhnlich benutzte Verfahren der Nachbehandlung, welches aus der Aera der Carmin-Hämatoxylintinction herübergenommen war, gliederte sich in 4 Theile: Entfärbung, Entwässerung, Aufhellung und Conservirung. Die Entfärbung geschah durch Alkohol, durch Säuren, durch Alkohol und Säuren; die Neuzeit fügte die Entfärbung durch Salze und Alkohol, durch Reductionsmittel, durch Oxydationsmittel und Alkohol hinzu.

Die Entwässerung wurde eigentlich allein durch Alkohol bewirkt, und zwar entweder gleichzeitig mit der Entfärbung durch denselben, oder, wo zur Entfärbung und Differenzirung Alkohol nicht benutzt wurde, nach derselben. Das Aufhellungsmittel wurde nur selten (Reduction durch Nelkenöl) zur Entfärbung und Differenzirung gebraucht.

Es ist selbstverständlich, dass theils zur Vereinfachung, theils zur Beseitigung von Uebelständen die Entwässerung und Aufhellung mit dem Fortschritt der Technik ebenso gut Modificationen unterliegen mussten, wie die Procedur der Entfärbung. In dieser Richtung sind folgende Neuerungen bemerkenswerth.

Die Entwässerung und Aufhellung in flüssigen Medien ersetzte ich (61) durch absolute Eintrocknung der Schnitte, der Einfachheit halber mittels starker Erhitzung, ähnlich wie sie Koch für Saftpräparate eingeführt hatte (ausnahmsweise auch durch langsames Trocknen bei niederer Temperatur, eventuell über Schwefelsäure). Koch hatte nur die Präcipitation flüssiger und stark tingibler Eiweissstoffe beabsichtigt. Bei der Erhitzung der Schnitte zeigte es sich, dass die absolute Eintrocknung noch den weiteren Vortheil mit sich bringt, dass sie das Structurbild, solange das thierische Gewebe ungefärbt bleibt, abschwächt

(ähnlich wie der Condensor) und dadurch alles Gefärbte, speciell die gefärbten Bakterien, schärfer hervortreten lässt. Alle organischen Gebilde werden beim Eintrocknen durchscheinender, schliesslich hornig und erleichtern dadurch die optische Isolirung gut gefärbter, in ihnen enthaltener Theile. Die Vorzüge dieser „Antrocknungsmethode“ in Bezug auf die Vereinfachung der ganzen Färbung, die Conservirung der Farben für Dauerpräparate und die mechanische Isolirung nicht zusammengehöriger Theile (z. B. Zoogloea und Protoplasma), die Aufdeckung natürlicher Spalten (Lymphräume) übergehe ich. Ebenso kann ich hier nicht auf die Ansichten verschiedener Autoren (Neisser, Ziegler u. A.) eingehen, welche aus der Abschwächung des Structurbildes des ungefärbten Präparates den Schluss zogen, dass die thierischen Gewebe hierdurch irreparabel verändert würden, während nur eine vorherige gute Färbung derselben dazu gehört, um die feinsten Einzelheiten mit derselben Deutlichkeit hervortreten zu lassen, wie an den gefärbten — und bereits stets absolut getrockneten — Bakterien. Die Eintrocknung schädigt natürlich die thierischen Gewebe nicht mehr und nicht weniger als die Bakterien, und für die Darstellung der letzteren in Schnitten scheint sich bereits meine Antrocknungsmethode der Anerkennung der meisten Bakteriologen (Neisser (51), Günther (34), Kühne (44)) zu erfreuen.

Während in der Antrocknungsmethode die schädlichen Einflüsse des Alkohols und der öligen Aufhellungsmittel (uncontrolirbare Ueberentfärbung) zugleich vermieden werden, stellte Kühne (43), speciell zur Vermeidung der ersteren, als allgemeines Princip der Entwässerung den Gebrauch alkoholischer Lösungen des zur Färbung verwandten Farbstoffs auf. Dieses Verfahren war allerdings schon oft in der Histologie verwandt worden, z. B. allgemein bei der Nachbehandlung pikringefärbter Präparate. Eisler (16) hatte sogar zu anderen histologischen Zwecken durch Hinzufügung verschiedener Farbstoffe, Eosin, Rubin, zu dem entwässernden Alkohol den Präparaten eine diffuse Contrastfärbung ertheilt. Aber die grundsätzliche, ausschliessliche Anwendung zur Entwässerung mit der Absicht, die

gleichzeitige Entfärbung zu vermeiden, datirt erst von Kühne's Arbeit. In der That ist es durchaus rationell, die gelegentlich bei der Entwässerung auftretende Entfärbung durch Alkohol ganz zu vermeiden, Entfärbung und Entwässerung vollständig zu trennen und, wenn die Differenzirung durch einfachen Alkohol gewünscht wird, dieselbe an den entwässerten Präparaten vorzunehmen. Kühne (43) bedient sich, wie oben bereits auseinandergesetzt, hierzu eines mit einem sauren Farbstoffe versetzten Alkohols und verlegt einen Theil der Differenzirung und Contrastfärbung in das aufhellende Oel (Fluorescin- resp. Eosinnelkenöl, s. oben).

Weigert hat als Ersatz des Alkohols, und zwar im Sinne des Differenzirungsmittels ebensowohl als des Entwässerungsmittels, das Anilin (71) vorgeschlagen. Hierzu werden die Schnitte nach Gram vorbereitet, mit Anilin-Gentianaviolett oder einem anderen Pararosanilin gefärbt, abgespült und auf dem Objectträger mit Jodjodkaliumlösung behandelt; das Wasser wird sodann abgezogen, auf das ausgebreitet am Glase haftende Präparat Anilinöl, eventuell mehrmals, getropft und nach geschehener Entfärbung durch Xylol ersetzt. Noch werthvoller als für die Mikroorganismen ist die Methode für fädiges Fibrin und dessen hyaline Derivate, welche eine helle, blaue Farbe annehmen.

Kühne (44) modificirt die Weigert'sche Anilinölbehandlung, indem er der concentrirten wässrigen Violettlösung sehr wenig Salzsäure (1 Tropfen auf 50,0 Farblösung) zusetzt, die Schnitte mit Wasser abspült, in Jodjodkalium fixirt, nach Abspülung im Wasser kurz in absoluten Alkohol eintaucht und die definitive Entfärbung im Schälchen in Anilinöl vornimmt.

Endlich wurde die Frage der Conservirung, welche lange Zeit eine dunkle gewesen war, geklärt. Ich vermochte zu zeigen (61), dass in Dauerpräparaten vornehmlich 3 Factoren den Anilinfarben schädlich werden, nämlich erstens Reste von zum Entfärben gebrauchten Säuren durch Bildung ungefärbter Verbindungen, sodann Reste der zur Aufhellung benutzten und in den Balsamen vorhandenen, verharzenden und dadurch reducirend wirkenden, ätherischen Oele durch Bildung ungefärbter Leukoproducte. Eine alle 3 Factoren zugleich eliminirende Methode ist die Antrocknungs-

methode mit Benutzung entölter Balsame. In den verschiedenen Oelmethoden hat man nach diesen Erfahrungen ebenfalls die schon früher mancherseits instinctiv vorgezogenen, öfters erwärmten, harten Balsame als Einschlussmittel benutzt und Kohlenwasserstoffe, besonders Xylol, zur Aufhellung substituirt. Kühne (44) zieht das Nelkenöl erst in Thymen oder Tereben aus und entfernt diese leicht flüchtigen Vehikel wiederum durch Xylol.

In Zukunft wird man mehr als bisher auch die älteren Einschlussmittel wässriger Natur (Sublimat-Glycerinleim), Salze, wie das zuerst von Koch gerühmte essigsaure Kali (1 : 2) (39), wieder heranzuziehen und überhaupt nach gut und doch nicht zu viel aufhellenden, die Farben nicht verändernden, wasserlöslichen Einschlussmitteln zu suchen haben, wo es neben der Darstellung der Bakterien auf Erhaltung des ungefärbten Structurbildes des thierischen Gewebes ankommt, während zur Conservirung der Färbung der thierischen Umgebung der Parasiten die Antrocknungsmethode stets ausreicht.

Merkwürdigerweise spielen in der Conservirung der histologischen Präparate bisher die Beizen der Färber noch keine Rolle; es wäre sehr lohnend, hierüber systematisch Versuche anzustellen. Nach meiner gelegentlichen Erfahrung ist es sehr vortheilhaft, die vollständig gelungenen Präparate nach der Entfärbung und vor der Aufhellung und Einbettung in sehr schwachen, wässrigen Lösungen von Tannin oder arseniger Säure (0,1—0,25 %) einige Zeit zu beizen. Die entstehenden Verbindungen des Gewebes, des Pigmentes und gedachter Säuren sind sehr beständig gegen alle entfärbenden Einflüsse, und ebenso gefärbt wie die zu Grunde liegende Verbindung des Farbstoffs mit dem Gewebe. Dieselben oder ähnliche Beizen wären angezeigt, wo man eine gelungene Färbung erhalten will, welche gegenüber einer erwünschten Contrastfärbung sich empfindlich zeigt (z. B. Methylenblau).

Färbungen in Mikroorganismen hervorzurufen durch successive Anwendung verschiedener Farbcomponenten ist bisher noch nicht gelungen. Nach den wenigen hierüber vorliegenden, hauptsächlich negativen Erfahrungen (65, 66) würde es

am ehesten möglich sein innerhalb der Zoogloea mancher Bakterien.

Wenn wir die Reihe aller angeführten Färbemethoden überblicken, so muss es uns auffallen, dass der einfachsten von allen, der einfachen directen Färbung, gar nicht gedacht ist. Vielleicht ist dieselbe wirklich in systematischer Weise zum Zwecke der Färbung von Bakterien in Schnitten nie angewandt worden, wird sie es doch zu anderen histologischen Zwecken in der Neuzeit selten genug.

Zur einfachen, directen Färbung (ohne Entfärbung) dürfen natürlich nur ungemein verdünnte Lösungen in Betracht kommen, wenn man durch die einmalige Färbung bereits eine tinctorielle Isolirung herbeiführen will. So pflegte Gerlach sehr stark verdünnte Goldchloridkaliumlösung zur Vergoldung der Nerven anzuwenden.

Ich habe diesem Gegenstande neuerdings mehr Aufmerksamkeit geschenkt und will die sehr einfache Methode beschreiben, welche mir zur Erzeugung directer Minimalfärbung (im Gegensatz zur Färbung durch maximale Entfärbung) allgemein als die praktischste erscheint. Der Apparat besteht aus einer leeren Flasche, auf welche lose ein mittelgrosser, gewöhnlicher Glastrichter aufgesetzt wird [1]). In den sich nach unten verengernden Hals des Trichters kommt zunächst ein Wattefläumchen, welches man mit einer stumpfen Nadel so weit in denselben hineinschiebt, dass in den Trichter eingegossenes Wasser nur sehr langsam hindurchtropft. Man giesst nun die äusserst verdünnte, noch eben wahrnehmbar gefärbte Farblösung in den Trichter und thut die Schnitte hinein, welche sich auf dem Wattepropfen im Trichterhalse sammeln. Wenn die Farbflotte nach 1—2—4—12 Stunden durchgelaufen ist, wird eine neue Portion in den Trichter gegossen.

Auf diese Weise erzielt man zweierlei. Jeder Tropfen der farbschwachen Lösung kommt mit den Schnitten sicher in Berührung und ist im Stande, seine Farbe an die am leichtesten färbbaren

1) Vergleiche meine entsprechende Trichtermethode zur Auswaschung von Gewebsstücken und Schnitten. (Monatshefte f. pr. Dermatologie. Bd. V. 1886. pg. 126.)

Bestandtheile abzugeben. Und zweitens steht die Färbung niemals still, was bei einfachem Hineinlegen der Schnitte in eine sehr farbschwache ruhende Flüssigkeit sehr bald eintreten würde.

Nimmt man von Zeit zu Zeit einen Schnitt heraus, so kann man die successive Anfärbung der verschiedenen Gewebsbestandtheile bei dieser Färbung im Trichter besser und freier von allen störenden Nebenumständen studiren als selbst bei andauernder Beobachtung eines sich im ruhenden Tropfen auf dem Objectträger färbenden Schnittes unter dem Mikroskop [1]).

Die directe Minimalfärbung in verdünnten Lösungen hat für bakterienhaltige Schnitte natürlich nur dort einen Zweck, wo die Bakterien eine um etwas — wenn auch noch so wenig — stärkere Anziehungskraft für die gewählte Farbe haben als das thierische Gewebe und mittels derselben langsam die Farbe aus der dünnen Lösung in sich aufspeichern und concentriren können. Am nächsten würde dieselbe der von Ehrlich eingeführten Methode der directen Färbung in solchen Farblösungen kommen, deren tinctorielle Kraft durch farblösende Zusätze (Eisessig, Glycerin, Alkohol) abgeschwächt ist. Diese heterogenen, abschwächenden Zusätze vertritt hier die Verdünnung mit Wasser. Beide Methoden verdienten gewiss mehr als bisher zur Färbung schwer isolirbarer Bakterien herangezogen zu werden (Typhusbacillen). Durch geringe Zusätze solcher Mittel, welche die Färbung der Bakterien erleichtern (Anilin, Alkalien) oder die des thierischen Gewebes relativ erschweren (Oxalsäure, Essigsäure), zu dem Lösungswasser geht die einfache Minimalfärbung mit farbschwachen Lösungen fast unmerklich in die Ehrlich'sche mit abgeschwächten Lösungen über.

Nach den vorstehenden historisch-kritischen Erörterungen können wir die Färbungen und Entfärbungen der Bakterien ganz im Allgemeinen zunächst eintheilen in monochromatische und polychromatische.

---

1) Zur Vergoldung kleiner Gewebsstückchen, zu gewöhnlichen Carmin- und Hämatoxylinfärbungen kann ich diese Methode aufs beste empfehlen.

Die monochromatischen Tinctionen zerfallen wiederum in die directen und indirecten, wenn wir kurz unter „indirecter" Färbung die Erzielung einer isolirten Tinction bestimmter Gewebsbestandtheile (hier Bakterien) durch übermässige Färbung und stufenweise bis maximale Entfärbung des Präparates verstehen wollen.

Die directe Färbung kann auf der Stufe der Färbung eines einzigen Gewebsabschnittes stehen bleiben (Minimalfärbung) oder zur Färbung mehrerer Gewebsabschnitte fortgeführt werden. Hierher gehören die Methoden der directen Färbung durch einfache, starke Verdünnung der Farblösung (Unna) und durch (mittels Essigsäure, Alkohol, Glycerin) abgeschwächte Farbflotten (Ehrlich, Rindfleisch, Ziehl, Kühne).

Zu den indirecten monochromatischen Färbungen gehören unsere gebräuchlichsten Methoden; sie sind einer nahezu unbegrenzten Variation und Vermehrung fähig und können alle sowohl mit als ohne Beize (Anilin, Alkalien etc.) zur Ausführung gelangen. Diese — allerdings sehr wichtige — Variante erhebe ich daher, als eine allen gemeinsame, nicht zum Eintheilungsprincip, sondern unterscheide die indirecten Färbungen zunächst danach, ob sie ein physikalisches oder chemisches Princip zur Entfärbung verwenden.

Physikalische Kräfte nehmen nach meiner Anschauung diejenigen Entfärbungen in Anspruch, welche den Ueberschuss der Farbe allein durch indifferente Lösungsmittel (Alkohol: Hermann Flemming; Anilin: Weigert) entfernen, und weiter auch diejenigen, welche durch vorherige Behandlung mit Oxydationsmitteln den (unveränderten) Farbstoff auf dem Gewebe lockern, so dass derselbe durch Alkohol leicht fortzuschwemmen ist (Wasserstoffsuperoxyd: Unna; Kali hypermanganicum: Lustgarten).

Chemische Kräfte kommen dagegen bei den meisten und wichtigsten indirecten Entfärbungen ins Spiel. Wir können dieselben bis jetzt in vier Kategorien eintheilen [1]). In allen bringen

1) Um Missverständnissen vorzubeugen, betone ich hier nochmals, dass das hier gegebene Schema sich zunächst nur auf die Färbung der Bakterien bezieht. Natürlich ist es cum grano salis auf die Färbung anderer und aller histologischer Objecte

wir eine Substanz mit dem gefärbten Gewebe in Berührung, welche zu dem Farbstoff eine ihr eigenthümliche Verwandtschaft geltend macht und ihn vermöge derselben dem Gewebe entzieht (die ersten drei) oder sich mit dem Farbstoff zu neuen Körpern umsetzt (vierte Kategorie).

In die erste Abtheilung stellen wir die Methoden, welche Säuren zur Entfärbung benutzen (HNO_3: Koch-Ehrlich, HCl: Orth, H_2SO_4: Neelsen u. s. f.). Die Säuren durchdringen alle gefärbten Antheile des Gewebes und bilden überall zunächst die Tripelverbindung von Gewebe + Farbsalz + Säure, was sich an der Farbenveränderung des Gewebes makroskopisch und mikroskopisch erkennen lässt. Je nachdem nun das Farbsalz in einzelnen Bestandtheilen stark, in anderen schwach fixirt ist, lässt bei der darauffolgenden Durchspülung mit Alkohol dort der Säureüberschuss die Verbindung: Gewebe + Farbsalz wieder los oder hier, mit dem Farbsalz zum mehrsäurigen Salz verbunden, das Gewebe allein wieder frei. Mit anderen Worten: dort bleibt das Gewebe in der alten Farbe gefärbt (Bakterien, Nuclein, Keratin), hier wird es entfärbt (Protoplasma, Collagen). Neben dieser Auswahl der Säure unter den überfärbten Gewebsbestandtheilen besteht ausserdem eine Einwirkung der Säuren auf die zu Grunde liegenden Gewebe selbst (Schrumpfung des Nucleins, Quellung des Collagens), welche für jene Selection durchaus nicht gleichgiltig ist. Darin besteht die Hauptdifferenz zwischen der Säureentfärbung und den nächstfolgenden Entfärbungsmethoden.

Zur zweiten Abtheilung gehören die Proceduren, welche durch Salzlösungen Entfärbung bewirken (Ka_2CO_3: Koch, Na_2CO_3: Wolff, viele Salze: Gottstein, Unna, Eisenchlorid: de Giacomi, unterchlorig-saures Natron, Kali hypermanganicum: Lustgarten). Der Vorgang ist, theoretisch genommen, derselbe wie bei der Säureentfärbung; nur bilden sich hier statt der mehr-

---

zu übertragen, mit den geringsten Veränderungen jedenfalls auf solche Objecte, welche wie die Bakterien sich vorzugsweise mit basischen Farbstoffen färben, z. B. Mitosen. Wo jedoch saure Farbstoffe vornehmlich in Frage kommen, ändern sich die chemischen Kategorien der Beizen (Alkalien) und Entfärbungsflüssigkeiten (Säuren) dementsprechend.

säurigen Salze: Doppelsalzverbindungen. Dass die Salze als Ganzes sich mit dem gefärbten Gewebe verbinden, zeigt die eigenthümliche Verfärbung unter dem Einflusse von NaClO, welche nicht mit der Entfärbung durch Cl identisch ist. Diese Abtheilung bedarf bei der unerschöpflichen Anzahl differenter Salze einer weit gründlicheren Durchforschung nach specifischen Reactionen, als sie bisher erfahren hat.

Eine dritte Abtheilung für sich bilden die verschiedenen Arten der Jodanwendung zum Zwecke der Entfärbung. Da bisher nur eine Klasse von Farbstoffen bekannt ist, die der Pararosaniline, zu welchen das Jod eine hervorragende Verwandtschaft besitzt, so kann man bisher diese ganze Kategorie auch noch die der Jod-Pararosanilinmethode nennen. Auch hier tritt, wie bei den Säuren und Salzen, zunächst überall die Tripelverbindung: Gewebe (= 1) + Pararosanilinsalz (= 2) + Jod (= 3) auf. Die nachfolgende Alkoholdurchspülung zerfällt aber nicht (wie bei der Salz- und Säuremethode) die Tripelverbindung hier etwa in die Verbindung: (1 + 2), welche bleibt, und freies Jod (3), welches ausgezogen wird, und dort in die Verbindung: (2 + 3), welche fortgespült wird, und das farblose Gewebe (1); ein solcher Effect tritt bei Einwirkung des Jods auf andere Farbstoffe, speciell auch auf die nahestehenden Rosanilinsalze auf; sie würde nichts Besonderes darstellen. Sondern die Verwandtschaft von Jod zu den Pararosanilinen ist so stark, dass hier die Tripelverbindung (1 + 2 + 3) bestehen bleibt (Bakterien) und dort die Verbindung Jodpararosanilin (2 + 3) als Ganzes ausgeschwemmt wird (alle übrigen Gewebsbestandtheile). Jod und Parosanilinsalz trennen sich eben nicht mehr.

Nach zwei Richtungen giebt dieser eigenartige Einfluss des Jods auf ein Pigment zu neuen Versuchsreihen Anlass. Einmal müssen alle möglichen Farbstoffe (im Reagensglase) auf ihre Verwandtschaft zum Jod geprüft werden. Und weiter wird es interessant sein, zu versuchen, ob andere Stoffe (Cl, Br, S etc.) und deren Verbindungen zu den Pigmenten ähnliche Beziehungen zeigen wie das Jod.

Zu dieser Gruppe gehören die Jodmethoden von Gram, Lutz, Unna, Günther, Weigert, Kühne.

In die vierte Abtheilung stelle ich die bis jetzt noch spärlichen Versuche, durch reducirende Mittel eine partielle Entfärbung der Pigmente durch Umwandlung in die entsprechenden Leukoproducte zu bewirken. Als ein ganz reines Beispiel dieser Art von Entfärbung haben wir bisher eigentlich nur die Nelkenölmethode zu registriren; das in das Gewebe eingedrungene Oel setzt sich mit dem Pigment zu verharztem Oel und dem entsprechenden Leukoproduct um. Sollte die Methode von Peters (Entfärbung mittels H_2SO_2) hierher gehören, was noch durchaus fraglich ist, so würde sie doch noch kein reines Beispiel einer Reductionswirkung liefern können, da in der Mischung von $HNaSO_2$ und Essigsäure stets eine andere entfärbende Wirkung, nämlich die eines Salzes, des essigsauren Natrons, concurrirt.

Die polychromatischen Tinctionen zerfallen in drei Unterabtheilungen. Am einfachsten liegt der Fall bei der Contrastfärbung der farblosen Reste bereits maximal entfärbter Gewebe. Ein allgemein anerkanntes Princip der Nachfärbung ist es — abgesehen von dem erstrebten Farbencontrast —, solche Farben zur Gegenfärbung zu wählen, welche zu dem tinctoriell isolirten Gewebsbestandtheil eine möglichst geringe Verwandtschaft besitzen und dieselben möglichst kurz und in solchen Lösungen anzuwenden, welche ebenfalls die Tinction jenes Gewebsbestandtheils erschweren, z. B. Schnitte mit gefärbten Tuberkelbacillen in neutraler, wässriger Lösung von Vesuvin, kokkenhaltige Präparate zuerst in Carmin, dann nach der Jodpararosanilinmethode u. s. f.

Die Möglichkeit, dass die contrastfärbende Farbflotte bei langer Einwirkung und stärkerer Verwandtschaft zu den tinctoriell zu isolirenden Bakterien die erste Färbung verdrängen kann, führte darauf, von dieser Umfärbung einen principiellen Gebrauch zur definitiven Tinction des Hintergrundes zu machen, und dadurch indirect zur tinctoriellen Isolirung der Bakterien (Koch's Umfärbung methylenblau gefärbter Tuberkelpräparate mittels Vesuvin.) Die so entstandene Methode der partiellen Umfär-

bung der Präparate zum Zwecke polychromatischer Färbung wurde besonders von Kühne in einer ganz neuen Richtung weiterverfolgt und vervollkommnet.

Als dritte hierher gehörige Gruppe hätten wir endlich die Methoden einzeitiger, polychromatischer Färbung zu nennen (im Gegensatz zu den vorhergehenden zweizeitigen), welche unstreitig bei grösserer Vervollkommnung die elegantesten und bequemsten Arten polychromatischer Färbung darstellen werden, zur Zeit aber noch an Sicherheit des Resultats nicht mit den früheren concurriren können. Eigentlich hat sich nur Gibbes bisher mit dieser Frage beschäftigt.

In der folgenden Tabelle stelle ich die bisherigen Methoden der Färbung und Entfärbung noch einmal übersichtlich zusammen:

- Färbung (mit oder ohne Zusatz von Beizen)
  - Monochromatische
    - Directe Färbung . . → 1. in verdünnten Lösungen; 2. in abgeschwächten Lösungen
    - Indirecte Färbung
      - Entfärbung durch physikalische Agentien → 3. durch Alkohol; 4. durch Anilin; 5. durch Oxydationsmittel und Alkohol
      - Entfärbung durch chemische Agentien → 6. durch Säuren und Alkohol; 7. durch Salze und Alkohol; 8. durch Jod und Alkohol; 9. durch Reducentia
  - Polychromatische . . .
    - Zwei- oder mehrzeitige Färbung → 10. Contrastfärbung farbloser Gewebsreste; 11. Partielle Umfärbung des Gewebes
    - . . . . . 12. Einzeitige Färbung.

Hamburg, im November 1887.

Literatur-Uebersicht.

1) Alvarez und Tavel, Recherches sur le bacille de Lustgarten. (Arch. de Phys. norm. et path. 17. 1885.)

2) Baumgarten, Ueber ein bequemes Verfahren, Tuberkelbacillen in Sputis nachzuweisen. (Centrlbl. f. med. Wiss. 1882. pg. 433.)

3) Baumgarten, Beiträge zur Darstellungsmethode der Tuberkelbacillen. (Zeitschr. f. wiss. Mikr. Bd. I. pg. 51.)

4) Biedert, Ein Verfahren, den Nachweis vereinzelter Tuberkelbacillen zu sichern, nebst Bemerkungen über die Färbbarkeit der Bacillen und Aetiologie der Tuberculose. (Berl. klin. Wochenschr. 1886. pg. 713.)

5) Bienstock, Zur Frage der sog. Syphilisbacillen und der Tuberkelbacillenfärbung. (Fortschr. d. Med. 1886. pg. 193.)

6) Bitter, Ueber Syphilis- und Smegmabacillen. (Virch. Arch. 106. pg. 209. 1886.)

7) Buchner, Ueber das Verhalten der Spaltpilzsporen zu den Anilinfarben. (Aerztl. Intelligenzbl. 1884. No. 33. pg. 370.)

8) Doutrelepont, Ueber Bacillen bei Syphilis. (Sitzgsb. der niederrhein. Ges. f. Natur- u. Heilk. in Bonn. 1884. pg. 263; 1885. 20. Juli; Berl. klin. Wochenschrift 1885. No. 10. pg. 160; Deutsche med. Wochenschr. 1885. No. 19; Mon. f. pr. Derm. Bd. IV. No. 11.)

9) Ehrlich, Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. (Arch. f. mikr. Anat. Bd. XIII. pag. 263.)

10) Ehrlich, Beiträge zur Kenntniss der granulirten Zellen. (Verhdl. der phys. Ges. Berlin. 17. Januar 1879.)

11) Ehrlich, Ueber die specifischen Granulationen des Blutes. (Verhdlgn. der phys. Ges. Berlin. 16. Mai 1879.)

12) Ehrlich, Methodologische Beiträge zur Physiol. und Pathol. der verschiedenen Formen der Leukocyten. (Zeitschr. f. klin. Med. 1880. Bd. I. pg. 553.)

13) Ehrlich, Färbung der Tuberkelbacillen. (Verhdlgn. d. Ver. f. i. Med. 1. Mai 1882; D. med. Woch. 1882. pg. 269.)

14) Ehrlich, Referat und Discussion über die gegen Koch's Entdeckung der Tuberkelbacillen neuerlichst hervorgetretenen Einwände. (D. med. Wochenschr. 1883. pg. 159.)

15) Ehrlich, Beiträge zur Theorie der Bacillenfärbung. (Charité-Annalen. Berlin. 1886.)

16) Eisler, Vereinfachung der Färbetechnik. (Fortschr. d. Med. 1886. pg. 197.)

17) Flemming, Ueber das E. Hermann'sche Kernfärbungsverfahren. (Arch. f. mikr. Anat. Bd. 16.)

18) Fraenkel, B., Ueber die Färbung des Koch'schen Bacillus und seine semiotische Bedeutung für die Krankheiten der Respirationsorgane. (Berl. klin. Woch. 1884. pg. 194, 214.)

19) Friedländer, Die Mikrokokken der Pneumonie. (Fortschr. d. Med. 1883. pg. 715.)

20) Friedländer, Ueber die färberische Reaction der Tuberkelbacillen. (Fortschr. d. Med. 1886. pg. 196.)

21) Friedländer, Notiz, die Färbung der Kapselmikrokokken betreffend. (Fortschr. d. Med. 1885. pg. 759.)

22) Fütterer, Ueber eine Modification der Ehrlich'schen Färbemethode für Tuberkelbacillen im Gewebe. (Virch. Arch. Bd. 101. 1885. pg. 198.)

23) de Giacomi, Färbung der Syphilisbacillen. (Schweiz. Corresp. XV. 12.)

24) de Giacomi, Die diagnostische Bedeutung des Nachweises der Tuberkelbacillen im Stuhl. (Fortschr. d. Med. 1883. pg. 145.)

25) Gibbes, Rapid method of demonstrating the tubercle bacillus without the use of nitric acid. (Lancet. 1883. pg. 771.)

26) Gottstein, Ueber Entfärbung gefärbter Zellkerne und Mikroorganismen durch Salzlösungen. (Fortschr. d. Med. 1885. No. 19.)

27) Gottstein, Referat über Smegma- u. Syphilisbacillen. Mitthlg. über Bac. des Cerumens. (Fortschr. d. Med. 1886. pg. 141.)

28) Gottstein, Die Beeinflussung des Färbungsverhaltens von Mikroorganismen durch Fette. (Fortschr. d. Med. 1886. No. 8.)

29) Gottstein, Bemerkungen über das Färbungsverhalten der Tuberkelbacillen. (Deutsche med. Wochenschr. 1886. No. 47.)

30) Gram, Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten. (Fortschr. d. Med. 1884. pg. 185.)

31) Gram, Ueber die Färbung der Schizomyceten in Schnittpräparaten. (Verhdlgn. des Intern. Congr. zu Kopenhagen. Section für allgem. Path. und pathol. Anat. Bd. I. 1886.)

32) Grigorjew, Zur Frage über die Färbbarkeit der Mikroorganismen nach der Ehrlich'schen Methode. Ref. von Heydenreich. (Zeitschr. f. wiss. Mikr. Bd. IV. pg 251.)

33) Günther, Ueber die Färbung der Recurrensspirillen in Blutpräparaten. (Fortschr. d. Med. 1885. pg. 755.)

34) Günther, Ueber die mikroskopische Färbung der wichtigsten pathogenen Bakterien mit Anilinfarbstoffen. (Deutsche med. Woch. 1887. No. 22.)

35) Hermann, Neue Methode der Kernfärbung. (Tagebl. d. Naturf. in Graz. 1875. pg. 105.)

36) Hueppe, Färbung der Sporen. (Die Methoden der Bakterienforschung. 2. Aufl. pg. 57.)

37) Klemperer, Ueber Syphilis- und Smegmabacillen. (Verein f. i. Med. Deutsche med. Woch. 1885. pg. 809.)

38) Koch, Untersuchungen über Bakterien. (VI. Beitr. z. Biologie d. Pflanzen von Cohn. Bd. II. 1877.)

39) Koch, Untersuchungen über die Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten. Leipzig 1878.

40) Koch, Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. (Mitthl. a. d. Kais. Gesundheitsamt. Bd. I. 1881.)

41) Koch, Ueber Tuberculose. (Vortrag, geh. in d. physiol. Gesellsch. Berlin, 24. März 1882.)

42) Koch, Die Aetiologie der Tuberculose. (Mitth. a. d. Kais. Gesundheitsamt. Bd. II. 1884.)

43) Kühne, Zur Färbetechnik. (Zeitschr. f. Hygiene. Bd. I. 1886. pg. 553.)

44) Kühne, Ueber ein combinirtes Universalverfahren, Spaltpilze im thierischen Gewebe nachzuweisen. (Dermatol. Studien, herausgeg. von Unna. Heft 6. Hamburg, L. Voss, 1887.)

45) Kükenthal, Vereinfachung der Färbetechnik. (Zool. Anz. 18. Januar 1886.)

46) Lichtheim, Zur diagnostischen Verwerthung d. Tuberkelbacillen. (Fortschr. d. Med. 1883. pg. 4.)

47) Löffler, Untersuchungen über die Bedeutung der Mikroorganismen für die Entstehung der Diphtherie. (Mitth. aus d. Kais. Ges.-A. Bd. II. pg. 421.)

48) Lustgarten, Die Syphilisbacillen. (Med. Jahrb. d. K. K. Ges. d. Aerzte. Wien 1885; Congress f. i. Med. in Wiesbaden, 8. April 1885.)

49) Lutz, Zur Morphologie des Mikroorganismus der Lepra. (Dermat. Studien, herausgeg. von Unna. Heft 1. 1886.)

50) Matterstock, Ueber den Bacillus der Syphilis. (Sitzgsb. der Würzb. phys.-med. Ges. 1885. 16. Mai; 6. Juni; Mitthlgn. aus d. med. Klinik d. Universität Würzburg: Wiesbaden, Bergmann, 1886; Deutsche med. Wochenschr. 1885. pg 837.)

51) Neisser, Histologische und bakteriologische Lepra-untersuchungen. (Virch. Arch. Bd. 103. 1886. pg. 355.)

52) Orth, Notizen zur Färbetechnik. (Berl. klin. Woch. 1883. pg. 421.)

53) Peters, Die Untersuchung des Auswurfs auf Tuberkelbacillen. Leipzig 1886.

54) Petri, Zur Färbung der Koch'schen Bacillen in Sputis, sowie über das gleiche Verhalten einiger Pilzzellen. (Berl. klin. Woch. 1883. pg. 739.)

55) Prior, Beitrag zur Färbbarkeit des Tuberkelbacillus. (Berl. klin. Woch. 1883. pg. 497.)

56) Rindfleisch, Färbung der Tuberkelbacillen. (Sitzgsb. d. Würzb. med.-phys. Ges. 1882. No. 8.)

57) Spina, Studien über Tuberculose. Wien 1883.

58) Spina, Untersuchungen über die Entfärbbarkeit der mit Anilinfarben tingirten Bakterien. Allg. Wiener med. Ztg. 1887. No. 15, 16.

59) Uuna, Beiträge zur Histologie und Entwicklungsgesch. der menschlichen Oberhaut und ihrer Anhangsgebilde. (Arch. f. mikr. Anat. Bd. XII. 1876.)

60) Unna, Anatomie der Haut. (Ziemssen's Handbuch. Bd. XIV. Thl. 1.)

61) Unna, Zur Färbung der Leprabacillen. Leprastudien 1886.

62) Unna, Zur Histologie und Therapie der Lepra. (Verhdlgn. d. V. Congr. f. i. Med. 1886.)

63) Unna, Die feinere Structur der Leprabacillen. (Monatsh. f. pr. Derm. 1886. No. 9.)

64) Unna, Die Rosaniline und Pararosaniline. Eine bakteriolog. Farbeustudie. (Dermat. Studien. Heft 4. 1887.)

65) Unna, Ueber Erzeugung von Vesuvin im Gewebe und über Metaphenylendiamin als Kerufärbungsmittel. (Mouatsb. f. pr. Dermat. VI. Bd. 1887. No. 2.)

66) Unna, Ueber weitere Versuche, Farben auf dem Gewebe zu erzeugeu und die chemische Theorie der Färbung. (Arch. f. mikr. Anat. Bd. XXX. pg. 38. 1887.)

67) Weigert, Färbung von Bakterien. (Ber. üb. d. Sitzungen d. schlesischen Gesellsch. f. vaterl. Cultur. 10. Dec. 1875.)

68) Weigert, Zur Tecbnik der mikroskop. Bakterienuntersuchungen. (Virch. Archiv. Bd. 84. 1881. pg. 275.)

69) Weigert, Neue Mittheilungen über die Pathogenie der acuten allgemeinen Miliartuberculose. (Deutsche med. Wocb. 1883. pg. 349.)

70) Weigert, Ueber Syphilis- und Smegmabacillen. (Deutsche med. Woch. 1883. pg. 885.)

71) Weigert, Ueber eine neue Methode zur Färbung von Fibrin und von Mikroorganismen. (Fortschr. d. Med. No. 8. 1887.)

72) Westphal, Ueber Mastzellen. Dissertat. Berlin.

73) Wolff, M., Zur Bakterienlehre bei accideutellen Wundkrankheiten. (Virch. Arch. Bd. 81. pg. 193, 386.)

74) Ziebl, Zur Färbung des Tuberkelbacillus. (Deutsche med. Wochenschr. 1882. No. 33. pg. 451.)

75) Ziehl, Zur Lebre von den Tuberkelbacillen, insbesondere über deren Bedeutung für Diagnose und Prognose. (Deutsche med. Wochenschr. 1883. pg. 62.)

76) Ziehl, Ueber die Färbung des Tuberkelbacillus. (Deutsche med. Wochenschr. 1883. pg. 247.)

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 436